

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom - Chemiker Thomas Christian Gerstberger

aus Dietersheim

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Thema:

Identifizierung von nukleären Export-Substraten mittels eines funktionellen Testsystems für nukleäre Exportsignale (NES) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Gutachter: Prof. Dr. Ed Hurt

PD Dr. Ralf Bischoff

Für Birgit

Für meine Eltern

*Die Wissenschaft ist die
Asymptote der Wahrheit, sie
nähert sich ihr unaufhörlich
an und erreicht sie nie.*

Victor Hugo, William Shakespeare

1864

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ed Hurt für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und die stetige Unterstützung.

Ich danke Herrn PD Dr. Ralf Bischoff für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Markus Künzler danke ich für die sehr gute Betreuung und Zusammenarbeit während der ersten Hälfte meiner Doktorarbeit. Liebe Grüße nach Zürich!

Besonderer Dank an Denise Lau, Katja Sträßer, Daniela Strauß, Jochen Baßler und Andreas Braunwarth für viele hilfreiche Diskussionen und die freundschaftliche Atmosphäre inner- und außerhalb des Labors.

Meinen beiden „Azubis“ Susanne Brettschneider und Nadine Schuhmacher möchte ich für die ausgezeichnete Mitarbeit danken.

Allen anderen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hurt danke ich für das gute Arbeitsklima und dafür, dass sie immer hilfsbereit mit Rat und Tat zur Stelle waren.

Ein dickes Dankeschön vor allem an Birgit für die Motivation und das Verständnis während der letzten Jahre, und an meine Eltern, die dies alles erst möglich gemacht haben.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
Einleitung	5
1. Aufbau und Struktur des Kernporenkomplexes	6
2. Der Ran-GTPase Zyklus	9
3. Die Protein-Familie der Karyopherine	10
4. Energetik des nukleozytoplasmatischen Transports	14
5. Mechanismen der Translokation durch die Kernpore	14
6. Importprozesse	16
6.1 Klassischer NLS-Protein Import	16
6.2 Import von UsnRNPs	17
6.3 Import von RNA-bindenden Proteinen	18
6.4 Import ribosomaler Proteine	19
7. Exportprozesse	20
7.1 Export von Proteinen mit Leucin-reicher NES	20
7.2 Export von Importin- α	23
7.3 RNA-Export	23
7.3.1 Export von tRNA	24
7.3.2 Export von snRNA	25
7.3.3 Export der ribosomalen Untereinheiten	26
7.3.4 Export von mRNA	30
8. Ansätze zur Identifizierung neuer Exportsubstrate	33
Ziel der Arbeit	35
Ergebnisse	37
1. Ein funktioneller Assay für nukleäre Exportsignale (NES)	37
1.1 Konstruktion eines NES-Test Plasmids (NESTP)	38
1.2 Funktionstest des funktionellen NES-Assays	40
1.2.1 Funktionstest mit homologen NESs	41
1.2.2 Funktionstest mit heterologen NESs	42
1.2.3 NES-Proteindomänen im funktionellen NES-Assay	43
2. Funktionelles Screening nach NESs	45
2.1 Übersicht der Resultate	45
2.2 Charakterisierung ausgewählter Kandidaten des NES-Assays	49
2.3 Exportmechanismen der ausgewählten NES-Kandidaten	51
2.3.1 Xpo1p unabhängige Transportsubstrate	51
2.3.2 Xpo1p abhängige Transportsubstrate	55
2.4 RPL5	58
2.4.1 <i>rpl5-ts</i> -Mutationen zeigen einen 60S-Exportdefekt	58
2.4.2 Rpl5p-eGFP akkumuliert in <i>nup49-ts</i> -Zellen	59
2.4.3 Einschränkung der NES in Rpl5p	60
2.4.4 <i>rpl5Δ(101-115)p-eGFP</i> ist nicht funktionell und akkumuliert im Kern	62

2.4.5 Mutationen in der möglichen NES-Sequenz von Rpl5p zeigen Export- und Wachstumsdefekte	66
2.4.6 Der Wachstumsdefekt der rpl5p-Punktmutanten wird nicht durch eine heterologe NES komplementiert	72
Diskussion & Ausblick	77
1. Ein funktioneller NES-Test um neue NES-Sequenzen zu finden	77
2. Ergebnisse des funktionellen NES-Assays	79
2.1 Kategorisierung der gefundenen Kandidaten	79
2.2 Charakterisierung ausgewählter Kandidaten	81
2.3 Funktion einer möglichen NES in Rpl5p	84
Material & Methoden	93
1. Material	93
1.1 Labormaterialien	93
1.2 Verwendete Plasmide	93
1.3 NES-Test Plasmid (NESTP)	97
1.4 Herstellung der Bibliotheken genomischer Hefe-DNA für die Durchführung des funktionellen NES-Assays	98
1.4.1 Erstellung von NESB-0.75	99
1.4.2 Erstellung von NESB-2.0	99
1.5 Verwendete Hefestämme	100
2. Methoden	102
2.1 Molekularbiologische Methoden	102
2.1.1 Allgemeine Methoden zur DNA Manipulation	102
2.1.2 Mutagenese von Plasmid DNA	102
2.1.3 Methoden und Medien für <i>S. cerevisiae</i>	102
2.1.4 Plasmid-Rückgewinnung aus <i>S. cerevisiae</i>	103
2.1.5 Präparation genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	103
2.1.6 Herstellung eines Hefezellenextraktes	103
2.1.7 Wachstumsanalyse von Hefezellen (Dotspot-Analyse)	104
2.1.8 Lokalisierung von Proteinen in der Zelle	104
2.1.9 Leptomycin B-Behandlung LMB sensibler Hefen	104
2.1.10 Analyse des 40S und 60S ribosomalen Exports	105
2.1.11 Bedingungen des NES-Komplementations-Assay in <i>S. cerevisiae</i>	105
2.1.12 Methoden und Medien für <i>E. coli</i>	105
2.2 Biochemische Methoden	106
2.2.1 RNA Profilanalyse & Sedimentationsanalyse mittels Saccharosedichtegradienten	106
2.2.2 TCA-Fällung von Proteinen	107
2.2.3 RNA Isolierung aus Saccharose-Gradienten Fraktionen	107
2.2.4 Sondenpräparation	107
2.2.5 Northern Hybridisierung	107
3. Datenbanken und Sequenzanalyse-Programme	108
Abkürzungsverzeichnis	109
Literaturverzeichnis	113
Anhang	129

ZUSAMMENFASSUNG

Der aktive Transport von Makromolekülen zwischen Zellkern und Zytoplasma wird durch lösliche Transportrezeptoren vermittelt, die ihre Substrate über spezifische Sequenzmotive erkennen und binden können. Je nach Richtung der anschließenden Translokation wird bei den Erkennungssequenzen zwischen nukleären Lokalisierungssignalen (NLS) und nukleären Exportsignalen (NES) unterschieden. Da insbesondere der nukleäre Export von Proteinen bei regulatorischen Prozessen und der Biogenese von RNA/Protein-Partikeln eine wichtige Rolle spielt, wurde in dieser Arbeit ein Assay entwickelt, der die funktionelle Identifizierung neuer Exportsignale erlaubt. Nachdem die Funktionalität dieses Systems anhand verschiedener NES-Kontrollsequenzen bestätigt worden war, wurde eine Durchmusterung des Hefegenoms nach neuen NES durchgeführt. Dabei konnten 77 Kandidaten, die eine in diesem System aktive Exportfunktion zeigen, identifiziert werden. Zwei dieser Kandidaten (mit Sequenzbereichen aus Bfr1p und Rpn11p) konnte trotz der gefundenen NES-Funktion und näherer Untersuchungen in bekannten Transportinmutanten bis jetzt noch kein Exportin zugeordnet werden. Für drei Kandidaten (mit Sequenzbereichen aus Nip1p, Scd5p und Rpl5p) konnte ein durch das Exportin Xpo1p vermittelter nukleärer Export nachgewiesen werden. Der als NES identifizierte Aminosäurebereich eines dieser Proteine, Rpl5p, wurde aufgrund einer möglichen Beteiligung am Export der ribosomalen 60S Untereinheit näher charakterisiert. Die NES in Rpl5p konnte durch den entwickelten funktionellen Assay weiter eingegrenzt werden und zeigt eine signifikante Homologie zum typischen Konsensusmotiv einer Leucin-reichen NES, der klassischen Erkennungssequenz des Exportins Xpo1p. Eingehende Deletions- und Mutationsanalysen der gefundenen NES-Domäne zeigten einen Funktionsverlust, nukleäre Akkumulation und Defekte in der Ribosomenbiogenese. Allerdings konnte eine direkte Beteiligung von Rpl5p am Export der ribosomalen 60S Untereinheit nicht nachgewiesen werden.

EINLEITUNG

Ein Hauptmerkmal eukaryontischer Zellen ist ihre Unterteilung in verschiedene Organellen, die durch Membranen voneinander getrennt sind. Anders als in Prokaryonten, die nur ein einziges zelluläres Kompartiment besitzen, können biochemische Prozesse in Eukaryonten durch diese Kompartimentalisierung besser reguliert und damit effizienter gestaltet werden. Hierfür ist ein höchst spezifiziertes und effizientes Transportsystem von Molekülen zwischen den einzelnen Organellen notwendig.

Einer dieser Transportprozesse ist der nukleozytoplasmatische Transport. Der Zellkern (Nukleus) enthält die genetische Information der Zelle, während die auf dieser Information basierende Proteinsynthese im Zytoplasma stattfindet. Der Nukleus und das Zytoplasma sind durch die Kernmembran voneinander abgetrennt. So müssen Ribonukleinsäuren (RNAs), wie z.B. Transfer-RNA (tRNA), Boten-RNA (mRNA) und ribosomale RNA (rRNA) von ihrem Syntheseort im Kern in das Zytoplasma exportiert werden. Andererseits muß eine Vielzahl von Proteinen und nukleären Ribonukleinproteinpartikel (small nuclear ribonucleoprotein particles, snRNPs) in den Zellkern importiert werden. Andere, zytoplasmatische Ribonukleinproteinpartikel wie die ribosomalen Untereinheiten oder der „signal-recognition particle“ (SRP) für die Sekretion von Proteinen werden im Zellkern assembliert und anschliessend aus dem Zellkern exportiert (Übersichten über den nukleozytoplasmatischen Transport finden sich in Görlich & Kutay, 1999; Komeili & O'Shea, 2001; Kuersten *et al.*, 2001; Mattaj & Englmeier, 1998b).

Alle bisher bekannten nukleozytoplasmatischen Transportprozesse erfolgen durch die Kernporenkomplexe (nuclear pore complexes, NPCs), große „Multiproteinkomplexe“, die in die Kernmembran (nuclear envelope, NE) eingebettet sind (Übersicht in Ryan & Went, 2000; Stoffler *et al.*, 1999; Went, 2000). Kleinere Moleküle bis zu einer Größe von 60 kDa und einem Durchmesser von 9 nm können passiv durch die Kanäle der Kernporen diffundieren, während größere Moleküle aktiv transportiert werden müssen. Dieser aktive Transport wird von löslichen Transportfaktoren vermittelt, die selbst zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma hin- und herwandern. Häufig wird auch ein aktiver Transport für Moleküle, wie z.B. tRNA oder Histone beobachtet, die theoretisch klein genug wären, passiv zu diffundieren (Görlich & Kutay, 1999; Talcott & Moore, 1999). Bevor näher auf für die vorliegende Arbeit wichtige Transportprozesse und die beteiligten Faktoren eingegangen

wird, sollen einige einleitende Erläuterungen zum Kernporenkomplex (NPC) gegeben werden.

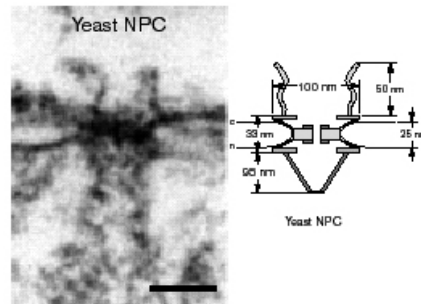
1. Aufbau und Struktur des Kernporenkomplexes

Der Kernporenkomplex (NPC) ist ein Multiproteinkomplex, der eine geschätzte Masse von 65 MDa in *S. cerevisiae* (Rout *et al.*, 2000; Rout & Blobel, 1993; Stoffler *et al.*, 1999) und 125 MDa in Vertebraten besitzt (Reichelt *et al.*, 1990). Dadurch ist der NPC von Vertebraten 30mal größer als das aus ca. 80 verschiedenen Proteinen zusammengesetzte und 4 MDa große Ribosom. Trotz des Größenunterschiedes der Kernporenkomplexe aus *S. cerevisiae* und höheren Eukaryonten ist ihre Grundstruktur hochkonserviert (Yang *et al.*, 1998). Abbildung 1A zeigt einen elektronenmikroskopischen Querschnitt einer Kernpore aus *S. cerevisiae* (Stoffler *et al.*, 1999) mit der doppelschichtigen Kernmembran rund um die Pore und der hohen Elektronendichte in der zentralen Ebene der Kernmembran. Aufgebaut wird die komplexe makromolekulare Struktur der Kernpore durch die Nukleoporine (Nups). In *S. cerevisiae* wurden durch genetische und biochemische Untersuchungen ungefähr 30 verschiedene Nukleoporine identifiziert (Doye & Hurt, 1997; Rout *et al.*, 2000). Übereinstimmend mit der strukturellen 8-fachen Rotationssymmetrie und der relativ geringen Anzahl von am Aufbau der Kernpore beteiligter Proteine, kann davon ausgegangen werden, dass die meisten Nukleoporine in 8-, 16- oder 32-facher Kopienzahl pro Kernpore vorkommen. Nach neueren biochemischen Untersuchungen sind 29 Nukleoporine am Aufbau der Kernpore in Vertebraten beteiligt (Cronshaw *et al.*, 2002) und nicht ca. 50 wie ursprünglich angenommen wurde (Fontoura *et al.*, 1999).

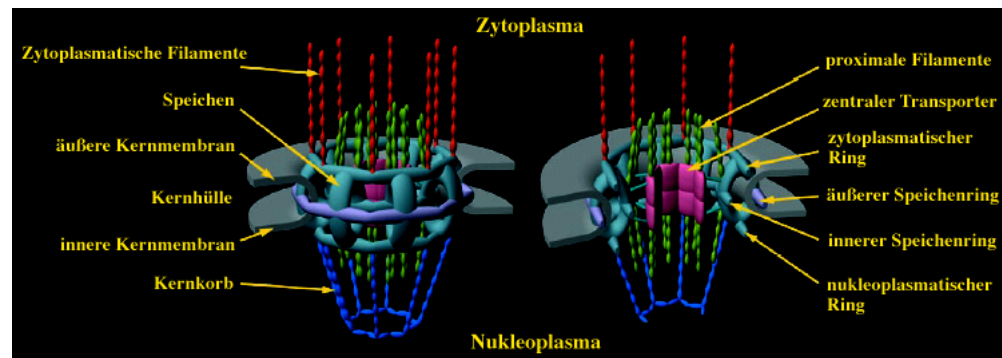
Der Kernporenkomplex besitzt eine 8-fache Rotationssymmetrie um die zentrale Achse und hat bei *S. cerevisiae* eine Ausdehnung von ca. 100 nm in der Breite und ca. 180 nm in der Höhe. Aufgebaut ist er aus einem zentralen, in der Kernmembran verankerten Speichenring, an den sich auf der nukleären Seite der Kernkorb ("nuclear basket") anschließt, der ca. 90 nm in das Nukleoplasma hineinragt. Auf der zytoplasmatischen Seite besitzt der Ring ungefähr 50 nm lange, zytoplasmatische Filamente (Stoffler *et al.*, 1999).

Eine Betrachtung des Aufbaus der Kernpore im Detail ergibt kleinere Unterschiede zwischen Hefe- und Vertebraten-NPCs (siehe Abb. 1B Rout & Aitchison, 2001). Neben der geringeren Größe und Masse des Hefe-NPCs fallen auch einige strukturelle Unterschiede auf. Der Vertebraten-NPC besitzt neben dem Speichenring auch noch einen zytoplasmatischen und einen nukleären Ring.

A



B



C

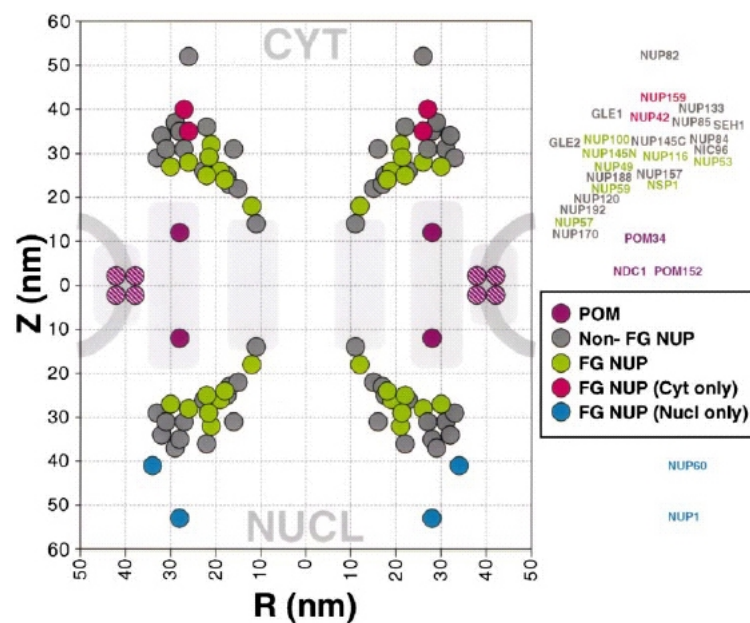


Abb. 1: Aufbau des Kernporenkomplexes.

(A) zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts einer Kernpore von *S. cerevisiae* und den zugehörigen schematischen Vergleich (Stoffler *et al.*, 1999).

(c = Zytoplasma; n = Zellkern; Maßstabslinie = 100 nm).

(B) zeigt eine illustrierte Darstellung des Aufbaus eines Vertebraten Kernporenkomplexes. Strukturelle Elemente sind mit Pfeilen gekennzeichnet (Rout & Aitchison, 2001).

(C) zeigt die Verteilung der Nukleoporine im Hefe Kernporenkomplex (Rout *et al.*, 2000).

Integrale Membranproteine:

Nicht-“FG-Repeat“-Nukleoporine (Non-FG-NUP):

Symmetrisch verteilte “FG-Repeat“-Nukleoporine (FG-NUP):

Zytoplasmatische “FG-Repeat“-Nukleoporine (FG-NUP (Cyt only)):

Nukleäre “FG-Repeat“-Nukleoporine (FG-NUP (Nucl only)):

Erläuterungen siehe Text.

violett

grau

grün

rot

blau

Auch der lumenale Ring des Vertebraten NPCs, der den Speichenring in der Kernmembran verankert, hat im Hefe-NPC keine direkte Entsprechung, allerdings kann hier dem hefespezifischen Membranring die gleiche Funktion zugewiesen werden (Yang *et al.*, 1998). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen, sowohl in *S. cerevisiae* als auch in Vertebraten, wurde elektronendichtes Material im Zentrum der Kernpore beobachtet (Stoffler *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1998). Es wird diskutiert, ob es sich dabei um ein strukturelles Element der Kernpore („Transporter“) oder um einen Transportkomplex während der Translokation handelt (Diskussion siehe Allen *et al.*, 2000; Fahrenkrog *et al.*, 2001).

Wahrscheinlich besitzen alle Hefenukleoporine entsprechende Homologe in höheren Eukaryonten (Cronshaw *et al.*, 2002; Doye & Hurt, 1997; Stoffler *et al.*, 1999; Vasu & Forbes, 2001). Man kann zwischen zwei Gruppen von Nukleoporinen unterscheiden, Nukleoporine ohne “FG-Repeat“-Sequenzen, die das Grundgerüst der Kernpore ausbilden (Doye & Hurt, 1997) und Nukleoporine, die “FG-Repeat“-Domänen besitzen. Die “FG-Repeat” Sequenzfolgen mit mehreren Wiederholungen der Aminosäure-Abfolge Phenylalanin-Glycin (FG) können mit Transportrezeptoren (Importine und Exportine) interagieren und stellen vermutlich die Bindestellen der Transportfaktoren bei der Translokation durch die Kernpore dar (Rout & Aitchison, 2001; Ryan & Wentte, 2000; Stewart *et al.*, 2001; Wentte, 2000).

Ein alternatives Modell der Translokation durch die Pore geht von einem hydrophoben Translokationskanal und einer Permeabilitätsbarriere aus, die durch die “FG-Repeats” der Nukleoporine ausgebildet wird (Ribbeck & Görlich, 2001; Ribbeck & Görlich, 2002) siehe hierzu 5.).

Durch statistische Auswertung immuno-elektronenmikroskopischer Lokalisierung ist die Position vieler Nukleoporine in der Kernpore grob beschrieben worden (Abb. 1C (Rout *et al.*, 2000)). Dabei wurde gefunden, dass viele Nukleoporine sowohl auf der zytoplasmatischen, als auch auf der nukleären Seite der Kernpore vorkommen. Einige weisen allerdings eine asymmetrische Lokalisierung auf. Nup1p, Nup2p und Nup60p lokalisieren exklusiv auf der nukleären und Nup159p, Nup42p und Nup82p auf der zytoplasmatischen Seite, was auf eine mögliche Beteiligung an der Kontrolle der Transportrichtung hinweisen könnte. So wurde für Nup60p (Denning *et al.*, 2001) und Nup2p (Dilworth *et al.*, 2001) eine Interaktion mit dem Importin- α/β -Dimer, Kap123 und Gsp1-GTP beschrieben. Nup60p/Nup2p könnte somit eine Bindestelle für nukleozytoplasmatische Transportkomplexe darstellen.

2. Der Ran-GTPase Zyklus

Für den aktiven Transport großer Moleküle werden neben Nukleoporinen auch lösliche Faktoren benötigt, die zwischen Nukleus und Zytoplasma hin- und herwandern können. Ein zentraler löslicher Faktor, der eine wichtige Rolle im nukleozytoplasmatischem Transport spielt, ist die kleine Ras-ähnliche GTPase Ran (Gsp1p in *S. cerevisiae*) (Moore & Blobel, 1993).

Ran lokalisiert im Gegensatz zu den meisten Vertretern der Ras-Superfamilie überwiegend im Zellkern (Bischoff & Ponstingl, 1991; Lau *et al.*, 2000). Wie jede Ras-ähnliche GTPase kommt Ran in der Zelle in zwei unterschiedlich gebundenen Zuständen vor. Entweder in der Guanosintriphosphat (GTP) gebundenen Form oder im Komplex mit Guanosindiphosphat (GDP) (Belhumeur *et al.*, 1993; siehe auch Abbildung 2 Kuersten *et al.*, 2001).

Durch die geringe eigene intrinsische GTP-Hydrolyse- und Nukleotidaustauschaktivität, muss die Umwandlung durch spezifische Faktoren stimuliert werden. Hierbei wird die Hydrolyse von gebundenem GTP zu $\text{GDP} + \text{P}_i$ von dem GTPase aktivierenden Protein RanGAP (Rna1p in *S. cerevisiae*) katalysiert, die durch Ran-bindende Proteine wie RanBP1 (Yrb1p in *S. cerevisiae*) oder RanBP2 (kein Homolog in *S. cerevisiae*) verstärkt wird. Der Austausch eines an Ran gebundenen GDPs gegen GTP wird durch den Guaninnukleotid-Austauschfaktor RCC1 (RanGEF) (Prp20p in *S. cerevisiae*) vermittelt (Azuma & Dasso, 2000; Dasso, 2001; Künzler & Hurt, 2001b).

Die exklusive Lokalisierung der beiden Ran-Effektoren in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle erzeugt einen Ran-GTP/GDP-Konzentrationsgradienten. Während RanGAP und die Co-Aktivatoren RanBP1 und RanBP2 im Zytoplasma lokalisieren, liegt RanGEF im Nukleus assoziiert mit Chromatin vor. Aufgründdessen liegt Ran im Kern hauptsächlich in der GTP gebundenen Form und im Zytoplasma als RanGDP vor (Dasso, 2001; Künzler & Hurt, 2001b). Dieses RanGTP Konzentrationsgefälle ist für die Regulation des nukleozytoplasmatischen Transports essentiell. So konnte gezeigt werden, dass durch eine Erhöhung der RanGTP-Konzentration im Zytoplasma permeabilisierter HeLa-Zellen die Transportrichtung teilweise umgekehrt werden kann (Nachury & Weis, 1999).

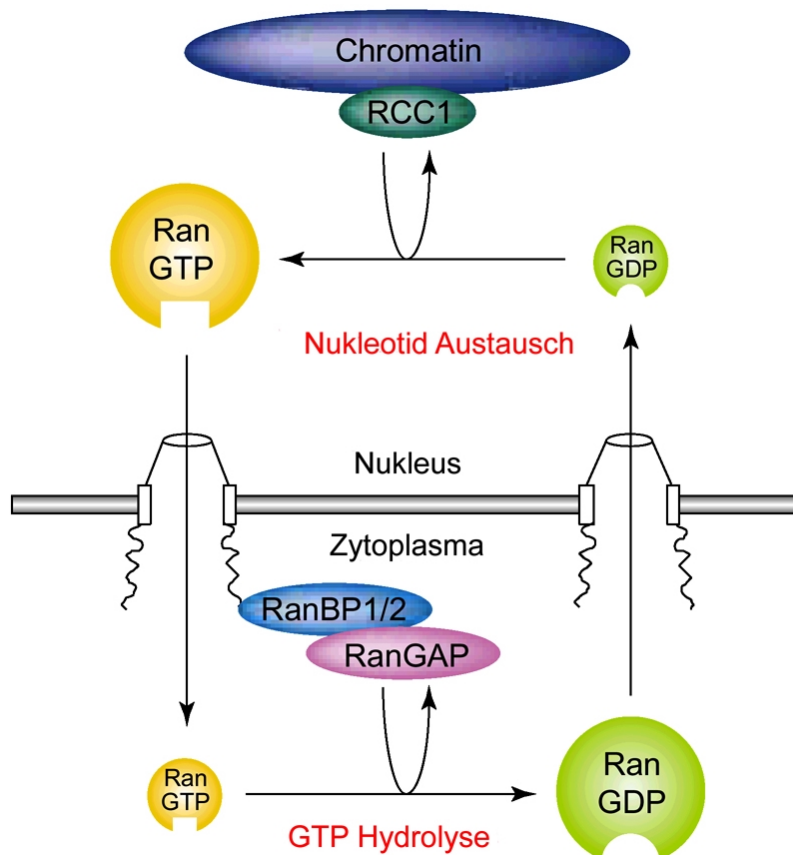


Abb. 2: Der Ran-GTP/GDP Zyklus (modifiziert nach (Kuersten *et al.*, 2001).
Erläuterungen siehe Text.

3. Die Protein-Familie der Karyopherine

Die meisten nukleozytoplasmatischen Transportprozesse werden durch eine Gruppe homologer Transportrezeptoren, die Karyopherine, vermittelt. Sie gehören zur Familie der Importin- β -ähnlichen Proteine, die nach dem ersten charakterisierten Mitglied Importin- β (Kap95p in *S. cerevisiae*) benannt wurden (Görlich *et al.*, 1995). In der Hefe *S. cerevisiae* sind bisher 14 Karyopherine bekannt (siehe Tabelle 1), die alle eine Größe zwischen 90 und 130 kDa aufweisen, während *H. sapiens* mindestens 22 Karyopherine besitzt (Görlich *et al.*, 1997; Görlich & Kutay, 1999). Je nach Richtung des vermittelten Transports werden sie weiter in Importine und Exportine eingeteilt. Nur vier der 14 Karyopherine in Hefe sind Exportine (Adam, 1999). Eine Ausnahmestellung unter den Karyopherinen besitzen Msn5p aus *S. cerevisiae* (Yoshida & Blobel, 2001) und humanes Importin13 (Mingot *et al.*, 2001), die sowohl den Export als auch den Import von Substraten vermitteln können. Dies ist ein interessanter Aspekt des nukleozytoplasmatischen Transports, da die Nutzung eines Karyopherins als Importin und Exportin eine optimale Ausnutzung der Transportkapazität

des Transportins bedeuten könnte. Allen Karyopherinen gemeinsam ist eine homologe N-terminale RanGTP-Bindungsdomäne. Mit ihren jeweiligen Transportsubstraten interagieren sie dagegen über eine C-terminale Domäne. Gleichzeitig können die Karyopherine mit den “FG-Repeats“ der Nukleopore interagieren und so die Translokation des Transportkomplexes durch die Kernpore ermöglichen.

IMPORTFAKTOREN			
NAME		ESSENTIELL	SUBSTRAT
Kap95p	Rsl1p/ Impβ	ja	NLS-enhaltende Proteine (hierbei wird die Bindung über Impα vermittelt) Histone (direktes Substrat)
Kap104p	Transportin	nein	mRNA bindende Proteine Nab2p, Nab4p/Hrp1p
Kap108p	Sxm1p	nein	Lhp1p und ribosomale Proteine, z.B. Rpl11p, Rpl25p, Rpl31p
Kap111p	Mtr10p	nein	Npl3p
Kap114p		nein	Tbp1p (TATA bindendes Protein)
Kap119p	Nmd5p	nein	Hog1p, TFIIIS
Kap120p	Lph2p	nein	nicht identifiziert
Kap121p	Pse1p	ja	ribosomale Proteine und Pho4p, Yra1p, Yra2p, Spo12p
Kap122p	Pdr6p	nein	Toa1p-Toa2p-Komplex
Kap123p	Yrb4p	nein	ribosomale Proteine
Kap142p	Msn5p	nein	RPA-Komplex

EXPORTFAKTOREN			
NAME		ESSENTIELL	SUBSTRAT
Kap124p	Crm1p/ Xpo1p	ja	NES-Proteine, Hog1p, Rna1p, Ssb1p, SRP-Komplex, Nmd3p-Rpl10p-60S ribosomale Untereinheit
	Cse1p	ja	Srp1p (Impα)
	Los1p	nein	tRNA
Kap142p	Msn5p	nein	Msn2p, phosphoryliertes Pho4p, Ste5p

Tab. 1: Karyopherine in *S. cerevisiae*.

Die Informationen in Tabelle 1 stammen aus der YPD Datenbank der Firma INCYTE. Siehe hierzu auch Literatur: Datenbankverzeichnisse.

Reguliert wird der aktive gerichtete Transport von Makromolekülen durch Transportsignale. Eine vereinfachte Darstellung des Imports und Exports wird in Abbildung 3 gezeigt. Importine binden ihr Substrat im Zytoplasma und importieren es durch den Kernporenkomplex in den Zellkern. Der Importkomplex trifft dort auf RanGTP, das an das Importin bindet und dadurch das Import-Substrat ablöst. Das Importin verlässt, gebunden an RanGTP, den Kern und wird im Zytoplasma durch RanGAP/RanBP1-, RanBP2-vermittelte Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP + P_i wieder zurückgewonnen, um für einen neuen Importzyklus zur Verfügung zu stehen.

Der Export von Proteinen läuft ähnlich ab. Hierbei ist die Bindung des Substrats an das Exportin im Kern von RanGTP abhängig. Der trimere Komplex aus Exportin/Substrat/RanGTP wandert durch die Kernpore, um im Zytoplasma durch RanGAP/RanBP1, RanBP2 vermittelte Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP + P_i gespalten zu werden. Das Exportin kehrt unbeladen in den Kern zurück (Conti & Izaurralde, 2001; Görlich & Kutay, 1999; Kuersten *et al.*, 2001; Mattaj & Englmeier, 1998b).

Durch die beschriebenen Import und Export Mechanismen kommt es zu einer Anreicherung von RanGDP im Zytoplasma. Jeder Transportvorgang, d.h. sowohl das Recycling der Importine, als auch der Export von Proteinen durch Exportine, bringt ein Ran-Molekül ins Zytoplasma. Deshalb muss RanGDP effizient in den Kern zurück importiert werden, um dort in die RanGTP-Form überführt zu werden. Hierfür ist ein Importin notwendig, das nicht zur klassischen Karyopherin-Familie gehört.

Den Re-Import von RanGDP übernimmt der Transportfaktor Ntf2p, der spezifisch RanGDP bindet und den Import durch Wechselwirkungen mit Proteinen des NPCs vermittelt. Im Kern wird Ntf2p wieder von Ran getrennt. Dies geschieht durch RanGEF (Prp20p in *S. cerevisiae*) stimulierten Austausch des an Ran gebundenen GDPs gegen GTP (Ribbeck *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass 2500 Ntf2p Homodimere pro Sekunde durch die Kernpore wandern können (Ribbeck *et al.*, 1998), was den Import von RanGDP sehr effizient macht.

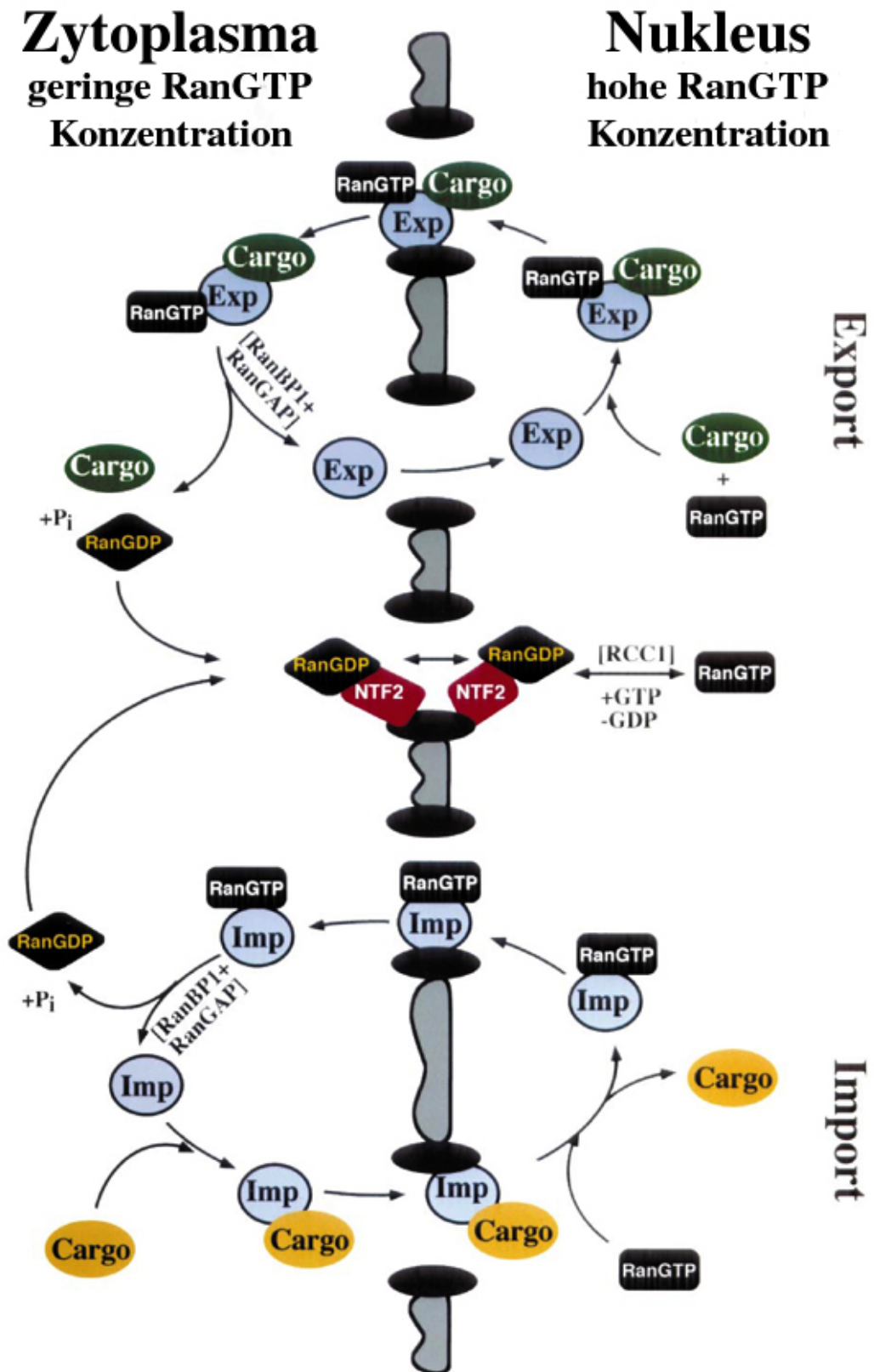


Abb. 3: Schematische Darstellung der Transportzyklen von Importinen (Imp) und Exportinen (Exp) und die Steuerung durch das Ran-System (modifiziert nach Görlich & Kutay, 1999).

NTF2: Nukleärer Transportfaktor 2.

Erläuterungen siehe Text.

4. Energetik des nukleozytoplasmatischen Transports

Eine bisher ungeklärte Frage im nukleozytoplasmatischen Transport ist die Bereitstellung der Energie. Es wurde früher davon ausgegangen, dass für den Translokationsprozess durch die Kernpore die Hydrolyse der Nukleotidtriphosphate ATP oder GTP (NTP) benötigt würde. Mittlerweile konnte über verschiedene Ansätze gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist. Zum Beispiel muss für den Import einer klassischen NLS durch Importin- α und Importin- β (siehe 6.1) kein GTP hydrolysiert werden (Schwoebel *et al.*, 1998). Für den NES-vermittelten Export (siehe 7.1) durch Crm1p wird zwar Crm1p und RanGTP benötigt, nicht aber die Hydrolyse von RanGTP (Englmeier *et al.*, 1999). Dies gilt allerdings nicht für einen kompletten Export- und Importzyklus. So wird sowohl für die Freisetzung des Exportsubstrates von seinem Exportin durch RanGTP-Hydrolyse, den Re-Import des RanGDPs durch Ntf2p als auch die zur Spaltung des Importkomplexes benötigte erneute Beladung von Ran mit GTP ein Molekül GTP verbraucht. Die Energie für den nukleozytoplasmatischen Transport könnte jeweils indirekt durch die Hydrolyse von RanGTP zur Verfügung gestellt werden. Andere energieverbrauchende Schritte werden beim Transport sehr großer Makromoleküle, wie z.B. mRNPs oder Ribosomen, vermutet. So könnte beispielsweise die Entwindung der RNA oder andere Konformationsänderungen der zu transportierenden Substrate, sowie die Ablösung von Proteinen, die nicht mit transportiert werden sollen, Energie erfordern (Adam, 1999; Görlich & Kutay, 1999; Vasu & Forbes, 2001).

5. Mechanismen der Translokation durch die Kernpore

Im Gegensatz zu den energieverbrauchenden nukleozytoplasmatischen Transportzyklen ist die Translokation eines Transportkomplexes durch die Kernpore ein reversibler und energieunabhängiger Prozess, dessen genauer Mechanismus bisher nicht geklärt werden konnte (Englmeier *et al.*, 1999; Kose *et al.*, 1997; Nachury & Weis, 1999; Nakielny & Dreyfuss, 1998; Ribbeck *et al.*, 1998; Schwoebel *et al.*, 1998; Weis *et al.*, 1996). Wie bereits beschrieben, können Transportrezeptoren mit “FG-Repeat”-enthaltenden Nukleoporinen direkt interagieren (Allen *et al.*, 2001; Bachi *et al.*, 2000; Clarkson *et al.*, 1996; Sträßer *et al.*, 2000b). Mutationsanalysen von Importin- β -ähnlichen Transportrezeptoren, NTF2 und des mRNA-Export Rezeptors Mex67p (siehe 7.3.4) konnten zeigen, dass diese Interaktionen

eine wichtige Rolle bei der Translokation durch die Kernpore spielen (Bayliss *et al.*, 2000; Bayliss *et al.*, 1999; Fribourg *et al.*, 2001; Sträßer *et al.*, 2000b). Im Moment werden unterschiedliche Modelle für die Translokation durch die Kernpore diskutiert, wobei bei den meisten dieser Modelle von einer erleichterten Diffusion ausgegangen wird, die durch Assoziation und Dissoziation der Transportkomplexe mit den “FG-Repeats” enthaltenden Nukleoporinen kontrolliert wird (Wente, 2000).

Das “Affinity Gradient Model” von Ben-Efraim & Gerace (2001) beschreibt die Translokation als eine Bewegung des Transportkomplexes entlang von Bindungsstellen mit steigender Affinität durch die Kernpore. Durch dieses sequenzielle Binden und Lösen des Transportkomplexes an unterschiedliche Nukleoporine könnte neben dem Ran-Gradienten (siehe 2) die Direktionalität der Translokation vermittelt werden. Dagegen spricht allerdings, dass die eigentliche Translokation vollständig reversibel ist und in beide Richtungen vermittelt wird (Englmeier *et al.*, 1999; Nachury & Weis, 1999; Ribbeck *et al.*, 1998). Zusätzlich ergaben kinetische Messungen, dass die hoch-affinen Interaktionen für die erleichterte Diffusion durch die Kernpore entbehrlich sind (Ribbeck & Görlich, 2001).

Beim “Brownian Affinity Gate Model” von Rout und Mitarbeitern (2000) ist der NPC Kanal von filamentösen Nukleoporinen umgeben, die alle mehrere “FG-Repeats” für die Bindung von Transportrezeptoren besitzen (Rout *et al.*, 2000). Der zentrale Kanal der Kernpore ist so schmal, dass Partikel über der Diffusionsgröße nicht eintreten können. Die Funktion der “FG-Repeats” wäre Transportrezeptoren einzufangen und so die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Transportkomplexes vor dem Kanal zu erhöhen und dadurch die Durchschleußung zu erleichtern. Das Modell geht davon aus, dass eine Bindung des Transportrezeptors an die “FG-Repeats” der Nukleoporine notwendig und ausreichend ist für die anschließende Translokation durch die Kernpore. Es erklärt aber nicht, wie größere Objekte, die eigentlich größer als der physikalische Durchmesser des schmalen Kanals sind, den Porenkomplex durchqueren können.

Das “Selective Phase Model” von Ribbeck & Görlich (2001, 2002) geht davon aus, dass der Durchmesser des Zentralkanals groß genug ist, um auch die größten bekannten Rezeptor-Substrat Komplexe durchzulassen (Feldherr & Akin, 1990; Pante & Kann, 2002; Ribbeck & Görlich, 2001). Dieser Kanal ist allerdings nicht vollständig geöffnet, sondern durch einen selektiven Abschnitt (“selective phase”), der in diesem Modell durch die “FG-Repeats” der Nukleoporine ausgebildet wird, geschützt. Die “FG-Repeats” können durch schwache hydrophobe Wechselwirkungen miteinander interagieren und dadurch eine Permeabilitätsgrenze ausbilden, die über der zentralen Kernporen-Ebene liegt. Diese

Barriere verhindert, dass hydrophile Makromoleküle durch die Kernpore gelangen. Transportrezeptoren können jedoch mit den “FG-Repeats” der Nukleoporine interagieren, dadurch deren schwache hydrophoben Wechselwirkungen lokal auflösen und die Permeabilitätsbarriere durchlässig machen. Durch die Interaktion der Rezeptoren mit den “FG-Repeats” kann der zentrale Kanal geöffnet werden. Dadurch wird die Permeabilitätsgrenze des Kernporenkomplexes überwunden und der Transportkomplex kann die Kernpore schnell durchqueren.

6. Importprozesse

Nachdem die allgemeinen Grundlagen des nukleozytoplasmatischen Transports beschrieben wurden, soll nun näher auf die Erkennungssequenzen der zu transportierenden Substrate eingegangen werden.

6.1 Klassischer NLS-Protein Import

Als erste Erkennungssequenzen für den Import von Proteinen wurden die einfache basische nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) und die zweigeteilte NLS identifiziert (Kalderon *et al.*, 1984; Robbins *et al.*, 1991). Bei der einfachen NLS handelt es sich um eine kurze basische Aminosäuresequenz, wie z.B. die NLS des SV40 “large” T Antigens. Die Sequenz lautet: PKKKRKV. Ein Beispiel für die zweigeteilte NLS findet sich in Nukleoplasmin, hier lautet die Erkennungssequenz KRPAAIKKAGQAKKKK. Die zwei Gruppen der basischen Aminosäuren (hier unterstrichen) sind durch 9 Aminosäuren getrennt (Görlich & Mattaj, 1996b; Nigg, 1997). Beide Arten von Importsignalen (NLSs) werden im Zytoplasma durch den heterodimeren Importin- α /Importin- β -Komplex erkannt. Hierbei wirkt Importin- α als Adapter zwischen dem NLS-tragenden Protein und Importin- β . Importin- α erkennt die NLS-Sequenz und bindet an sie. Die Bindung von Importin- α an Importin- β wird über die N-terminale Importin- β -bindende Dömane (IBB) vermittelt (Görlich *et al.*, 1995; Görlich & Kutay, 1999). Importin- α spielt bei der eigentlichen Translokation durch die Kernpore und der Spaltung des Importkomplexes offensichtlich keine Rolle, sondern fungiert anscheinend ausschließlich als Adapter zwischen dem Importsubstrat und Importin- β (Görlich *et al.*, 1996a; Weis *et al.*, 1996). Importin- β interagiert mit den “FG-Repeats” der Nukleoporine und mit Ran-GTP.

In *S. cerevisiae* ist jeweils nur ein Gen bekannt, das für Importin- α (Srp1p) bzw. für Importin- β (Kap95p) kodiert, während in höheren Eukaryonten mehrere Importin- α -homologe Proteine existieren. Interessanterweise zeigen einige dieser Faktoren eine gewebe- und entwicklungsspezifische Expression. Dazu kommt noch, dass sie unterschiedliche Bindungs-Spezifitäten zu NLS-Proteinen aufweisen (Nachury *et al.*, 1998; Nadler *et al.*, 1997; Prieve *et al.*, 1996; Sekimoto *et al.*, 1997). Dies deutet darauf hin, dass in höheren Eukaryonten Importprozesse für einzelne Gewebearten spezifisch reguliert werden.

6.2 Import von UsnRNPs

UsnRNPs (Uridin-reiche kleine nukleäre RNPs, „uridine-rich small nuclear RNPs“) sind Polymerase II Transkripte aus snRNAs, die im Nukleus synthetisiert und dann ins Zytoplasma exportiert werden (siehe 7.3.3), um dort zu reifen. Diese Reifung beinhaltet die Komplexbildung der RNA mit den „Sm core“ Proteinen und die Methylierung der „Cap“-Struktur (Trimethylkappe m_3G) (siehe Fischer *et al.*, 1997; Lührmann *et al.*, 1990; Mattaj, 1998a). Offensichtlich beinhalten der „Sm core“ Protein-Komplex und die Trimethylkappe Signalsequenzen, welche die reifen UsnRNPs in den Kern bringen können (Fischer *et al.*, 1991; Fischer & Lührmann, 1990; Fischer *et al.*, 1993). Diese dadurch gebildete Import-Erkennungssequenz von UsnRNPs gehört zur Klasse der zweigeteilten NLSs. Direkte Untersuchungen des Imports *in vivo* ergaben, dass Importin- α hierzu nicht benötigt wird (Palacios *et al.*, 1997). Allerdings weisen experimentelle Ansätze auf eine Beteiligung von Importin- β am Import von UsnRNPs hin. So führte z.B. eine Verminderung von Importin- β zu einer Blockierung des Imports von UsnRNPs, die durch Zugabe von Importin- β wieder aufgehoben werden konnte (Palacios *et al.*, 1997).

Der Rezeptor für das bisher unidentifizierte Signal des „Sm core“ Protein-Komplexes wurde noch nicht charakterisiert, während der Rezeptor für das Signal der Trimethylkappe bekannt ist. Es handelt sich hierbei um Snurportin1, das ähnlich wie Importin- α im klassischen NLS-Import als Adapter zwischen der Erkennungssequenz und Importin- β wirkt (Huber *et al.*, 1998). Snurportin1 besitzt ebenfalls eine N-terminale IBB-Domäne für Importin- β -Bindung, es weist allerdings keine weiteren Sequenzhomologien zu Importin- α auf. Der Import von UsnRNPs verläuft über einen Snurportin1/Importin- β -abhängigen Transportweg, der dem Import der klassischen NLS über Importin- α /Importin- β ähnelt. Snurportin1 wird durch Crm1p wieder ins Zytoplasma exportiert (Paraskeva *et al.*, 1999).

Weitere Mechanismen des Imports von UsnRNPs sind möglich, da die zweigeteilte NLS nicht nur die Trimethylkappe sondern auch die “Sm core“ Struktur beinhaltet, deren Rezeptor bisher nicht identifiziert werden konnte.

6.3 Import von RNA-bindenden Proteinen

Ein weiteres sehr gut charakterisiertes Importsignal ist die M9-Domäne von hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) in höheren Eukaryonten. Das hnRNP A1 Protein beinhaltet ein C-terminales Sequenzmotiv, das reich an Glycin und aromatischen Aminosäuren ist. Es besitzt eine Länge von 38 Aminosäuren und ist somit um einiges länger als die klassische NLS von SV40 (Siomi & Dreyfuss, 1995; Weighardt *et al.*, 1995). Als Rezeptor dieses Transportsignals wurde Transportin, ebenfalls ein Mitglied der Importin- β -Familie, identifiziert. Es erkennt die M9-Domäne des Substrates direkt (Fridell *et al.*, 1997; Pollard *et al.*, 1996).

Wie beim Importin- α -/ β -vermittelten Transport wird der Importkomplex, bestehend aus hnRNP A1 und Transportin, im Zellkern durch RanGTP dissoziiert (Izaurrealde *et al.*, 1997). Interessanterweise stellt die M9-Domäne von hnRNP A1 aus höheren Eukaryonten nicht nur eine für den Import notwendige Erkennungssequenz dar, sondern wird auch für den Re-Export benötigt. Somit kommt es zu einem kontinuierlichen Hin- und Herwandern von hnRNP A1 zwischen Kern und Zytoplasma (Michael *et al.*, 1995), wobei das am Export beteiligte Exportin bisher nicht identifiziert wurde.

Mutationen von Kap104p, dem Homolog von Transportin1 in *S. cerevisiae*, führten zu einem Import-Defekt des hnRNP-Proteins Nab2p. Auch ein weiteres hnRNP-Protein Hrp1p/Nab4p wird von Kap104p importiert (Aitchison *et al.*, 1996; Nakielny & Dreyfuss, 1996). Die Erkennungssequenzen in diesen Proteinen wurden als “RG-nuclear localization signals” (RG: Aminosäurebuchstaben-Code für Arginin, Glycin) beschrieben (Lee & Aitchison, 1999). Diese Benennung soll die in Nab2p und Hrp1p/Nab4p gefundenen Domänen von den klassischen NLSs abgrenzen. Es bestehen ebenfalls keine offensichtlichen Sequenzhomologien zur bekannten M9-Domäne-Sequenz des hnRNP A1 aus höheren Eukaryonten. Interessanterweise ist für die Dissoziation des Importkomplexes im Kern die Anwesenheit von RanGTP nicht ausreichend, vielmehr muss RNA anwesend sein, um den Importkomplex aus Nab2p oder Hrp1p/Nab4p und Kap104p zu trennen (Lee & Aitchison, 1999).

Ein weiteres Importin eines RNA-bindenden Proteins in *S. cerevisiae* ist Mtr10p. Es konnte gezeigt werden, dass Mtr10p das zwischen Zytoplasma und Zellkern hin- und herwandernde mRNA-bindende Protein Npl3p importiert (Pemberton *et al.*, 1997; Senger *et al.*, 1998). Die Erkennungssequenz in Npl3p ist hierbei eine RGG-Box (RGG: Aminosäurebuchstaben-Code für Arginin, Glycin, Glycin). Auch hier wurde gezeigt, dass die alleinige Präsenz von RanGTP nicht ausreicht, um den Transportkomplex zu dissoziieren, sondern ebenfalls RNA anwesend sein muss (Senger *et al.*, 1998). Ein weiteres Beispiel für einen solchen Mechanismus ist der Import des Transkriptionsfaktors Tbp1p durch das Importin Kap114p. Erst durch die Anwesenheit von TATA-Box enthaltender DNA kommt es zur Dissoziation des Importkomplexes (Pemberton *et al.*, 1999). Die Notwendigkeit zusätzlicher Faktoren zur Dissoziation des Transportkomplexes könnte einen Mechanismus darstellen, die Importsubstrate nicht nur durch die Kernpore, sondern direkt bis zu ihrem intranukleären Bestimmungspunkt zu transportieren.

6.4 Import ribosomaler Proteine

Ribosomale Proteine, die im Zytoplasma synthetisiert werden, müssen in den Nukleus und anschließend in den Nukleolus importiert werden, um dort zusammen mit der ribosomalen RNA die prä-ribosomalen Untereinheiten zu bilden (zur Biogenese der ribosomalen RNA siehe auch 7.3.4). Bisher ist allerdings noch nicht geklärt, ob diese Proteine einzeln oder als vorgeformte Komplexe importiert werden. Studien von ribosomalen Proteinen aus *S. cerevisiae* und humaner ribosomaler Proteine ergaben, dass diese mehrere mögliche Importsignal-Sequenzen enthalten (Moreland *et al.*, 1985; Quaye *et al.*, 1996; Russo *et al.*, 1997; Schaap *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1995; Underwood & Fried, 1990). Es könnte sich allerdings auch um Signale zur Komplexbildung handeln. Zum Import solcher Komplexe aus mehreren ribosomalen Proteinen wäre nur ein klassisches Importsignal notwendig. Dieses müsste jedoch nach Export der ribosomalen Untereinheiten inaktiviert werden, um einen sofortigen Re-Import zu vermeiden.

Das am besten charakterisierte Importsignal eines ribosomalen Proteins aus *S. cerevisiae* ist die zweigeteilte NLS am C-terminalen Ende von Rpl25p (Schaap *et al.*, 1991). Proteine mit klassischen NLS-Sequenzen werden wie beschrieben über den NLS-Importin- α / β Weg importiert. Sie zeigen in einem Hefestamm, der ein mutiertes Allel des Nukleoporins *NSP1* trägt, einen Importdefekt. Im Gegensatz dazu weist ein L25-NLS-Reporterprotein diesen Defekt nicht auf (Nehrbass *et al.*, 1993; Schaap *et al.*, 1991). Dies bedeutet, dass der Import

von Rpl25p nicht über einen Importin- α / β -vermittelten Mechanismus abläuft. Es konnte gezeigt werden, dass Proteine, die das L25-Importsignal tragen mit zwei Vertretern der Importin- β -Familie in Hefe, nämlich Kap123p und Pse1p (Kap121p) interagieren (Rout *et al.*, 1997; Schlenstedt *et al.*, 1997). So akkumuliert das ansonsten nukleäre L25-NLS-Reporterprotein in einem $\Delta kap123$ -Stamm im Zytoplasma. Wenn man die Bedeutung des Imports ribosomaler Proteine bedenkt, ist es sehr überraschend, dass mit Kap123p ein nicht essentielles Protein das alleinige Importin sein könnte. Tatsächlich existiert ein zweiter Exportweg für ribosomale Proteine, der über das in *S. cerevisiae* essentielle Protein Pse1p vermittelt wird. Somit kann davon ausgegangen werden, dass beide Proteine in vielleicht redundanter Art miteinander den Import bewerkstelligen.

Einen weiteren Faktor, der am Import ribosomaler Proteine beteiligt sein könnte, stellt Sxm1p dar (Rosenblum *et al.*, 1997; Seedorf & Silver, 1997). Es interagiert mit drei ribosomalen Proteinen (Rpl11p, Rpl25p und Rpl31p) und kann durch Pse1p-Mutanten oder einer Kap123p Deletion hervorgerufene Wachstumsdefekte supprimieren (Rosenblum *et al.*, 1997). Als Transportsubstrat wurde das La-Homolog in *S. cerevisiae*, Lhp1p, identifiziert. Lhp1p spielt wahrscheinlich eine Rolle im Reifungsprozess der Prä-tRNA (Calvo *et al.*, 1999; Yoo & Wolin, 1997). Es wurde gezeigt, dass Lhp1p in einem $\Delta sxm1$ -Hefestamm ins Zytoplasma misslokalisiert (Rosenblum *et al.*, 1997). Dies weist auf eine generelle Beteiligung von Sxm1p an Importprozessen hin, trotzdem muss eine tatsächliche Beteiligung am Import ribosomaler Proteine noch nachgewiesen werden.

7. Exportprozesse

7.1 Export von Proteinen mit Leucin-reicher NES

Ein Kennzeichen des nukleozytoplasmatischen Transports durch die Kernpore ist die Bidirektionalität, wobei den stattfindenden bereits beschriebenen Importreaktionen in den Zellkern vermutlich genau so viele Exportprozesse ins Zytoplasma gegenüberstehen. So muss die im Kern gebildete RNA ins Zytoplasma exportiert werden, um dort für die Proteinsynthese zur Verfügung zu stehen. Da die meisten RNA-Formen als Ribonukleoprotein Partikel transportiert werden, wurde vermutet, dass auch der Export über Proteine mit Exportsignalen vermittelt wird.

Das erste und wahrscheinlich best-charakterisierte Exportsignal ist die Leucin-reiche NES (nuclear export signal), die in zwei unterschiedlichen Proteinen entdeckt wurde, im

zellulären Protein-Kinase-Inhibitor PKI (Wen *et al.*, 1995) und in dem Rev-Protein von HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) (Fischer *et al.*, 1995). PKI terminiert im Kern die Wirkung der cAMP abhängigen Protein Kinase A (PKA) durch Bindung an dessen C-Terminus mit anschließendem Export. Das HIV-1 Rev Protein ist für den effizienten Export von ungespleißter und teilweise gespleißter viraler mRNA verantwortlich.

Das Konsensusmotiv der Leucin-reichen NES lautet **L-X₂₋₃-(F, I, L, V, M)-X₂₋₃-L-X-(I, L)**, wobei die vier Leucin-Reste essentiell für die Funktion der NES sind (Bogerd *et al.*, 1996). Dieses Exportsignal kann auch auf andere Proteine übertragen werden, wodurch ansonsten nukleäre Proteine ins Zytoplasma transportiert werden können (Fischer *et al.*, 1995; Wen *et al.*, 1995).

Erste Ansätze, den Export-Rezeptor für die Leucin-reiche NES zu finden, basierten auf 2-Hybrid-Versuchen in Hefe. Durch das HIV-1 Rev-Protein als “Köder“ wurden das Hefe-Protein Rip1p (Rev interacting protein) (Stutz *et al.*, 1995) und das humane Protein hRIP/RAB1 (Rev activation domain binding protein) identifiziert (Bogerd *et al.*, 1996; Fritz *et al.*, 1995). Bei beiden Proteinen handelte es sich allerdings nicht um die direkten Exportrezeptoren der Leucin-reichen Rev-NES. Sowohl Rip1p als auch RAB1 besitzen “FG-Repeats”, die charakteristisch für Nukleoporine sind. Da Transportrezeptoren an “FG-Repeats” in Nukleoporinen binden, handelt es sich wahrscheinlich um indirekte Interaktionspartner. Ein wichtiger Schritt zur Identifizierung des Exportrezeptors der Leucin-reichen NES war die experimentelle Beobachtung, dass das fungizide Antibiotikum Leptomycin B (LMB) sowohl den Export von Rev selbst, als auch den durch Rev vermittelten Export von RNA blockiert (Wolff *et al.*, 1997). LMB ist das Produkt einer *Streptomyces* Spezies und inhibiert Crm1p-vermittelten Export bereits in nanomolarer Konzentration (Hamamoto *et al.*, 1983a; Hamamoto *et al.*, 1983b). Das zelluläre Zielprotein von LMB wurde in *Schizosaccharomyces pombe* identifiziert. Es handelt sich um das essentielle Protein Crm1p (für “chromosome region maintenance”) (Fornerod *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997; Nishi *et al.*, 1994; Ossareh-Nazari *et al.*, 2000), welches ursprünglich in einem genetischen “Screen” nach Chromosomendefekten in *S. pombe* identifiziert wurde (Adachi & Yanagida, 1989).

Die Sequenzverwandtschaft von Crm1p zu Mitgliedern der Karyopherin-/Importin- β -Familie, speziell im Bereich der Ran Bindungsdomäne, und die Tatsache, dass Crm1p an mehrere Nukleoporine, wie z.B. Nup214, binden kann, unterstützten die Vermutung, dass Crm1p der gesuchte Exportrezeptor für Leucin-reiche NES-Proteine ist. Crm1p wird deshalb auch Xpo1p (Exportin1) genannt (Stade *et al.*, 1997).

Mehrere unabhängige Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen zeigten, dass Xpo1p direkt mit der Leucin-reichen NES interagiert. So weisen *XPO1*-Punktmutanten sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* nicht nur Wachstumsdefekte, sondern auch einen starken Export-Defekt von NES-Reportern auf (Fukuda *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997). Die Interaktion von Xpo1p und NES-Substrat ist LMB sensitiv (Fornerod *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997; Ossareh-Nazari *et al.*, 2000). Die Inhibierung von Xpo1p durch LMB ist ein nur in höheren Eukaryonten und in *S. pombe* auftretender Effekt, während *S. cerevisiae* keine Blockierung des Transports durch Zugabe von LMB zeigt (Hamamoto *et al.*, 1983a; Hamamoto *et al.*, 1983b; Wolff *et al.*, 1997). Kudo und Mitarbeiter (1999) konnten zeigen, dass die Inhibierung der CRM1-Funktion durch LMB von einem konservierten Cystein im CRM1-Gen abhängig ist. LMB kann in einer der Michael Reaktion ähnlichen Addition den Schwefel der Thiol-Gruppe von Cystein kovalent binden. Cystein ist in allen LMB-sensitiven Organismen, wie z.B. *H. sapiens* oder *S. pombe*, in der "central conserved region" (CCR) konserviert, in der die Interaktion zwischen LMB und *XPO1* stattfindet (Kudo *et al.*, 1999). *S. cerevisiae* trägt an vergleichbarer Position in der CCR des *XPO1*-Gens einen Threonin-Rest. Durch einen gezielten Austausch dieses Threonin-Restes gegen die Aminosäure Cystein konnte eine LMB-sensitive *xpo1*-Mutante erzeugt werden (Neville & Rosbash, 1999). Somit kann die Methode der LMB-Behandlung nun auch in *S. cerevisiae* zur Untersuchung des Xpo1p vermittelten Exports benutzt werden (Neville & Rosbash, 1999). Der genaue Mechanismus der zur Inhibierung des Xpo1p vermittelten Exportes durch LMB führt konnte allerdings noch nicht aufgeklärt werden.

Obwohl die Leucin-reiche NES von zellulären oder viralen Proteinen das am Besten untersuchte und verstandene Exportsignal für Xpo1p darstellt, wurden bereits Xpo1p-Substrate beschrieben, die keine klassische Leucin-reiche NES besitzen. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass auch andere nukleäre Exportsignale existieren. So konnte z.B. für das Ran bindende Protein Yrb1p in Hefe gezeigt werden, dass es durch Xpo1p exportiert wird (Künzler *et al.*, 2001a). Studien mit mutierten und gekürzten Yrb1p-Proteinen ergaben, dass für den Export von Yrb1p die gesamte Ran-Bindungsdomäne notwendig ist, die allerdings keine klassische Export-Sequenz enthält. Ein weiteres Protein, dass durch Xpo1p exportiert wird und keine klassische Leucin-reiche NES besitzt ist Snurportin1 (siehe 6.2). Xpo1p bindet 50-mal stärker an Snurportin1 als an das Rev-Protein. Die strukturellen Voraussetzungen für diese starke Interaktion zwischen Snurportin1 und Xpo1p konnten bisher noch nicht aufgeklärt werden (Paraskeva *et al.*, 1999).

7.2 Export von Importin- α

Alle am nukleozytoplasmatischen Transport beteiligten Faktoren werden als zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und herwandernde Proteine beschrieben. Adaptoren und Rezeptoren für den Import in den Nukleus werden nach der Importreaktion unbeladen wieder ins Zytoplasma exportiert. Importine der Importin- β -Familie gelangen wie bereits beschrieben an RanGTP gebunden wieder ins Zytoplasma zurück.

Der Adapter Importin- α (Srp1p in *S. cerevisiae*) wird, nach dem im Komplex mit Importin- β vermittelten Import eines NLS-Substrates, durch einen von Importin- β unabhängigen Prozess exportiert. Es benutzt hierzu CAS ("cellular apoptosis susceptibility protein") für den Re-Export ins Zytoplasma (Köhler *et al.*, 1999; Kutay *et al.*, 1997). CAS ist ein Mitglied der Importin- β -Familie, das eine, mit 137 Aminosäuren Länge, relativ große Exportsequenz in Importin- α erkennt (Herold *et al.*, 1998). CAS bindet Importin- α in Anwesenheit von RanGTP und es konnte gezeigt werden, dass CAS in *in vivo* und *in vitro* Export-Reaktionen den Export von Importin- α stimuliert (Kutay *et al.*, 1997).

Die funktionelle Interaktion zwischen Importin- α und CAS ist evolutionär konserviert. So ist das Homolog von CAS in *S. cerevisiae*, das essentielle Protein Cse1p (Xiao *et al.*, 1993), ebenfalls am Export von Srp1p in Hefe beteiligt (Hood & Silver, 1998; Künzler & Hurt, 1998; Solsbacher *et al.*, 1998). Durch Punktmutationen im *CSE1*-Lokus hervorgerufene konditionelle Mutanten zeigen nicht nur eine nukleäre Akkumulation von Importin- α und Cse1p, sondern auch eine Misslokalisierung von NLS-Substraten im Zytoplasma. Dieser Defekt wird offensichtlich durch eine Limitierung von Importin- α im falschen Kompartiment und eine dadurch verursachte Abnahme von Importprozessen hervorgerufen und kann durch Überexprimierung von Importin- α unterdrückt werden.

7.3 RNA-Export

Die unterschiedlichen RNA-Arten - mRNA, rRNA, tRNA und snRNA - werden im Kern synthetisiert und danach ins Zytoplasma exportiert. Anders als beim Export von Proteinen, die meistens einzeln exportiert werden, liegen zahlreiche RNAs im Kern als RNP-Partikel mit einer Vielzahl gebundener Proteine vor. Sowohl die RNA, als auch die sie bindenden Proteine, können Transportsignale enthalten. Mikro-Injektionsexperimente in *Xenopus*-Oozyten konnten zeigen, dass der Export von RNA aus dem Zellkern rezeptorvermittelt ist, da er durch einen injizierten Überschuss der jeweiligen RNA gesättigt werden kann. Jede

RNA-Spezies (mRNA, rRNA, tRNA und snRNA) besitzt einen eigenen spezifischen Exportweg, da ein Überschuss einer RNA nur den eigenen Export sättigt, aber nicht den der anderen RNA-Formen (Fischer *et al.*, 1995; Jarmolowski *et al.*, 1994).

7.3.1 Export von tRNA

Transfer RNA (tRNA) wird im Zellkern transkribiert, modifiziert und danach ins Zytoplasma exportiert, um dort an der Proteinbiosynthese teilzunehmen (Großhans *et al.*, 2000b; Wolin & Matera, 1999). So müssen einige Basen, Zuckerreste und ihre 5'- und 3'-Enden modifiziert und eine CCA-Sequenz an das 3'-Ende angehängt werden. Möglicherweise wird bereits im Kern die korrekte Struktur der tRNA überprüft. Anscheinend wird diese und die richtige 5'- und 3'-Prozessierung der tRNA für deren Export benötigt, da reife tRNAs im Gegensatz zu prä-tRNAs effizienter exportiert werden können (Arts *et al.*, 1998b; Lipowsky *et al.*, 1999). Somit kann der selektive Export von reifen tRNAs als ein effizienter Kontrollmechanismus gesehen werden. Manche tRNA-Arten enthalten Introns, die vor dem Export herausgespleißt werden (Wolin & Matera, 1999).

Der Export von tRNA wird durch ein eigenes Exportin aus der Familie der Importin- β -Familie vermittelt. Es handelt sich hierbei um Los1p in *S. cerevisiae* (Hellmuth *et al.*, 1998) bzw. Exportin(tRNA) oder Xpo-t in höheren Eukaryonten (Arts *et al.*, 1998b; Kutay *et al.*, 1998). Die Bindung von tRNA an Xpo-t bzw. Los1p ist auf die gleiche Weise wie die Substratbindung an andere Exportine reguliert. Reife tRNA bindet an Los1p bzw. Xpo-t und RanGTP und wird nach Ausbildung des trimeren Exportkomplexes ins Zytoplasma exportiert. Dort wird der Transportkomplex durch RanGAP/RanBP1-, RanBP2-induzierte RanGTP Hydrolyse dissoziiert (Kutay *et al.*, 1998). Los1p interagiert direkt mit der tRNA (Arts *et al.*, 1998a; Hellmuth *et al.*, 1998; Kutay *et al.*, 1998), obwohl ihm ein offensichtliches RNA-Bindungsmotiv fehlt. Desweiteren interagiert Los1p wie alle Karyopherine genetisch und physikalisch mit Nukleoporinen (Hellmuth *et al.*, 1998; Simos *et al.*, 1996).

Da Los1p allerdings in *S. cerevisiae* nicht essentiell ist und eine Deletion von *LOS1* nur zu einem schwachen Exportdefekt intronloser tRNA führt, scheint der Los1p vermittelte Export von tRNA nicht der einzig mögliche Transportweg zu sein. Der Translationsfaktor eEF-1A und tRNA-Synthetasen wurden kürzlich mit einem Los1p unabhängigen, aber eventuell Aminoacylierungs-abhängigen Transportweg für tRNA in Verbindung gebracht (Großhans *et al.*, 2000a). Deletionen der für eEF-1A oder der tRNA-Synthetasen kodierenden Gene, kombiniert mit einer Deletion von *LOS1*, führen zu einer synthetischen Letalität, d.h. durch

Kombination zweier nicht letaler Disruptionen oder Mutationen kommt es zum Zelltod. Dies beobachtet man z.B. bei Proteinen, die genetisch oder biochemisch miteinander interagieren. Desweiteren zeigen Mutationen in tRNA-Synthetasen und in eEF-1A eine nukleäre Akkumulation der tRNA. Diese Ergebnisse wurden kürzlich bestätigt, indem in höheren Eukaryonten ein neues Exportin, Exportin5, identifiziert wurde, das für den nukleären Export des eEF-1A/tRNA-Komplexes verantwortlich ist (Bohnsack *et al.*, 2002; Calado *et al.*, 2002). eEF-1A bindet nicht direkt an Exportin5, sondern über aminoacylierte tRNA. Exportin5 ist das zweite Karyopherin neben Exportin-t, das direkt an RNA binden kann und so den Export vermittelt. Interessanterweise stellt Msn5p das Hefehomolog zu Exportin5 dar (Bohnsack *et al.*, 2002) und könnte somit als zusätzlicher Exportfaktor für tRNA in Hefe fungieren. Eine Mislokalisierung von tRNA kann auch durch eine Inhibierung der Addition des 3'-terminalen CCA-Endes erreicht werden (Großhans *et al.*, 2000a; Sarkar & Hopper, 1998). Zudem supprimiert eine Überexpression des zur CCA-Addition notwendigen Proteins Cca1p den durch Depletion von *LOS1* hervorgerufenen tRNA-Exportdefekt. Cca1p könnte somit eine weitere mögliche Komponente eines von Los1p unabhängigen tRNA-Exportweges sein (Feng & Hopper, 2002; Großhans *et al.*, 2000a).

7.3.2 Export von snRNA

Ein weiterer von Xpo1p vermittelter Exportprozess, ist der Export von UsnRNAs, die im Kern als Monomethyl-G-Kappen-tragende Transkripte der RNA-Polymerase II synthetisiert werden. Diese Transkripte werden zur Modifizierung ins Zytoplasma exportiert (siehe auch 6.2). Der Re-Import der UsnRNPs verläuft wie bereits beschrieben über das Snurportin1/Importin- β -Heterodimer in den Kern, wo sie am Spleißen der Prä-mRNA beteiligt sind.

Der Exportprozess von UsnRNAs stellt einen vergleichsweise komplizierten Mechanismus dar. So benötigt man für den Exportkomplex von UsnRNAs nicht nur Xpo1p als Exportin, RanGTP und das Substrat, sondern auch drei weitere Adapterproteine. Experimente zur Identifizierung des Exportins zeigten, dass der Export von UsnRNPs durch einen Überschuss an NES-Peptiden und Leptomycin B (LMB) inhibiert werden kann (Fischer *et al.*, 1995; Fornerod *et al.*, 1997). Es konnte ausserdem nachgewiesen werden, dass eine Reduzierung der nukleären RanGTP-Konzentration durch Injektion von RanGAP und RanBP1 in *Xenopus* Oozyten Nuklei zu einer Blockierung des Exports führt (Izaurralde *et al.*, 1997).

Anders als tRNAs können snRNAs nicht direkt an ihren Exportrezeptor binden. Als Adaptoren für den Export wirken der heterodimere "cap binding complex" (CBC) und

PHAX (phosphorylated export adaptor for RNA export). Der CBC besteht aus zwei Untereinheiten, CBP20 und CBP80, und kann die 5'-Kappe der UsnRNA binden, was für den Export notwendig ist (Izaurrealde *et al.*, 1995). Allerdings wurde durch Bindungsstudien deutlich, dass zur Ausbildung eines Exportkomplexes für UsnRNAs weitere Proteine notwendig sind. So binden rekombinantes CBC, Xpo1p, RanGTP und snRNAs nicht direkt aneinander. Erst durch die Zugabe eines vollständigen Zellextrakts kommt es zur Ausbildung des Exportkomplexes (Ohno *et al.*, 2000). Dadurch wurde ein 55 kDa großes Protein identifiziert, das als spezifischer Adapter für den Export von UsnRNAs wirkt. Dieses Protein wurde erst p55 und später PHAX genannt (Ohno *et al.*, 2000). Es bindet an den oben beschriebenen CBC-UsnRNA Komplex und kann über seine NES mit Xpo1p und RanGTP interagieren. Für diese Wechselwirkung mit Xpo1p-RanGTP muss PHAX phosphoryliert vorliegen (Ohno *et al.*, 2000). Eine Dissoziation des Exportkomplexes im Zytoplasma benötigt die Hydrolyse von RanGTP und die Dephosphorylierung von PHAX, wobei die Reihenfolge dieses Prozesses *in vivo* bisher noch nicht geklärt ist. Möglicherweise ist die RanGTP-Hydrolyse hauptsächlich für die Freisetzung des Exportins verantwortlich, während die Dephosphorylierung für die Ablösung der UsnRNA von CBC und PHAX nötig ist. Studien haben ergeben, dass PHAX im Kern hauptsächlich in phosphorylierter und im Zytoplasma in dephosphorylierter Form vorliegt (Ohno *et al.*, 2000). In der Hefe *S. cerevisiae* ist, im Gegensatz zu höheren Eukaryonten, über die Biogenese von UsnRNAs noch nicht viel bekannt (Lygerou *et al.*, 1999). Es gibt zum Beispiel keine Hinweise auf einen Export der UsnRNPs zur Reifung ins Zytoplasma. Vielmehr scheinen sie ausschließlich im Kern zu assemblieren.

7.3.3 Export der ribosomalen Untereinheiten

Ribosomen sind Ribonukleoprotein-Partikel (RNPs), die in Eukaryonten aus einer großen (60S) und einer kleinen (40S) Untereinheit bestehen und für die Proteinsynthese im Zytoplasma benötigt werden. Sie sind aus verschiedenen rRNAs und ribosomalen Proteinen aufgebaut. In *S. cerevisiae* besteht die kleine 40S Untereinheit aus 32 ribosomalen Proteinen und der 18S rRNA, während die 60S Untereinheit in Hefe aus 45 ribosomalen Proteinen und der 5S, 5.8S und 25S rRNA aufgebaut ist. Die Synthese und die Prozessierung der Untereinheiten finden im Nukleolus, einem spezialisierten Unterbereich des Zellkerns, statt. Hier laufen auch die rRNA Transkription und viele der notwendigen rRNA-Reifungsprozesse ab. In allen Eukaryonten wird die Synthese der rRNA nicht durch einfache Transkription der einzelnen rRNA-Spezies, sondern durch mehrere gekoppelte

posttranskriptionelle Schritte erreicht (Baßler, 2001b; Fatica & Tollervey, 2002; Kressler *et al.*, 1999; Lafontaine & Tollervey, 2001; Venema & Tollervey, 1999; siehe hierzu Abb. 4). Dazu kommt, dass alle am Zusammenbau der Untereinheiten beteiligten ribosomalen und nicht-ribosomalen Proteine in den Kern importiert werden müssen (siehe 6.4). Durch genetische und biochemische Ansätze wurden ca. 90 nicht-ribosomale Proteine identifiziert, die bei der Biogenese der Ribosomen beteiligt sind. So wurden Endonukleasen, Exonukleasen, RNA-Helikasen, RNA-modifizierende Proteine und snoRNA-bindende Proteine beschrieben (Fatica & Tollervey, 2002; Kressler *et al.*, 1999; Lafontaine & Tollervey, 2001; Venema & Tollervey, 1999).

Die rRNA-Prozessierungsschritte im Nukleolus und Nukleus sind relativ gut beschrieben, während über den Export der ribosomalen Untereinheiten nicht annähernd soviel bekannt ist. Die starke Verknüpfung der Prozessierungsschritte der Ribosomenbiogenese und des intrazellulären Transports der ribosomalen Untereinheiten macht es schwierig, zwischen direkten Exportdefekten und durch Prozessierungsfehler hervorgerufene indirekten Defekten zu unterscheiden.

Unterschiedliche Ansätze wurden unternommen, den Export der einzelnen Untereinheiten aufzuklären. So ergaben Mikroinjektions-Experimente von radioaktiv markierten Ribosomen in *Xenopus* Oozyten Zellkerne (Bataille *et al.*, 1990; Fischer *et al.*, 1995; Khanna-Gupta & Ware, 1989; Pokrywka & Goldfarb, 1995), dass der Export von Ribosomen unidirektionell ist. Es handelt sich um einen sättigbaren, rezeptor- und energieabhängigen Prozess, der funktionelle Kernporenkomplexe benötigt. Durch direkte Lokalisierungsstudien verschiedener Reporterproteine für die jeweilige Untereinheit kann der ribosomale Export verfolgt und damit beteiligte Faktoren identifiziert werden. Für die Untersuchung des Exports der 60S Untereinheit wurden Rpl11p- oder Rpl25p-GFP Fusionsproteine verwendet (Gadal *et al.*, 2001a; Hurt *et al.*, 1999; Stage-Zimmermann *et al.*, 2000). Zusätzlich zum nativen Protein wird das jeweilige Fusionsprotein in die große Untereinheit eingebaut und kann als visueller Marker beobachtet werden.

Der Export der kleinen ribosomalen 40S Untereinheit kann durch ein *in situ* Hybridisierungsverfahren gegen die 5'ITS (interne transkribierte Spacerregion) der 18S rRNA untersucht werden (Gleizes *et al.*, 2001; Moy & Silver, 1999). Ein anderer Ansatz verwendet die GFP-markierten ribosomalen Proteinen Rps2p oder Rps3p (Milkereit *et al.*, 2002) als visuelle Reporterproteine. Die Ansätze zur Untersuchung des Exportes der ribosomalen Untereinheiten von Hurt *et al.*, 1999, Moy & Silver, 1999 und Stage-Zimmermann *et al.*, 2000 ergaben, dass für den Export beider Untereinheiten ein intakter

Ran-Zyklus und ein funktioneller Kernporenkomplex notwendig sind (Hurt *et al.*, 1999; Moy & Silver, 1999; Stage-Zimmermann *et al.*, 2000).

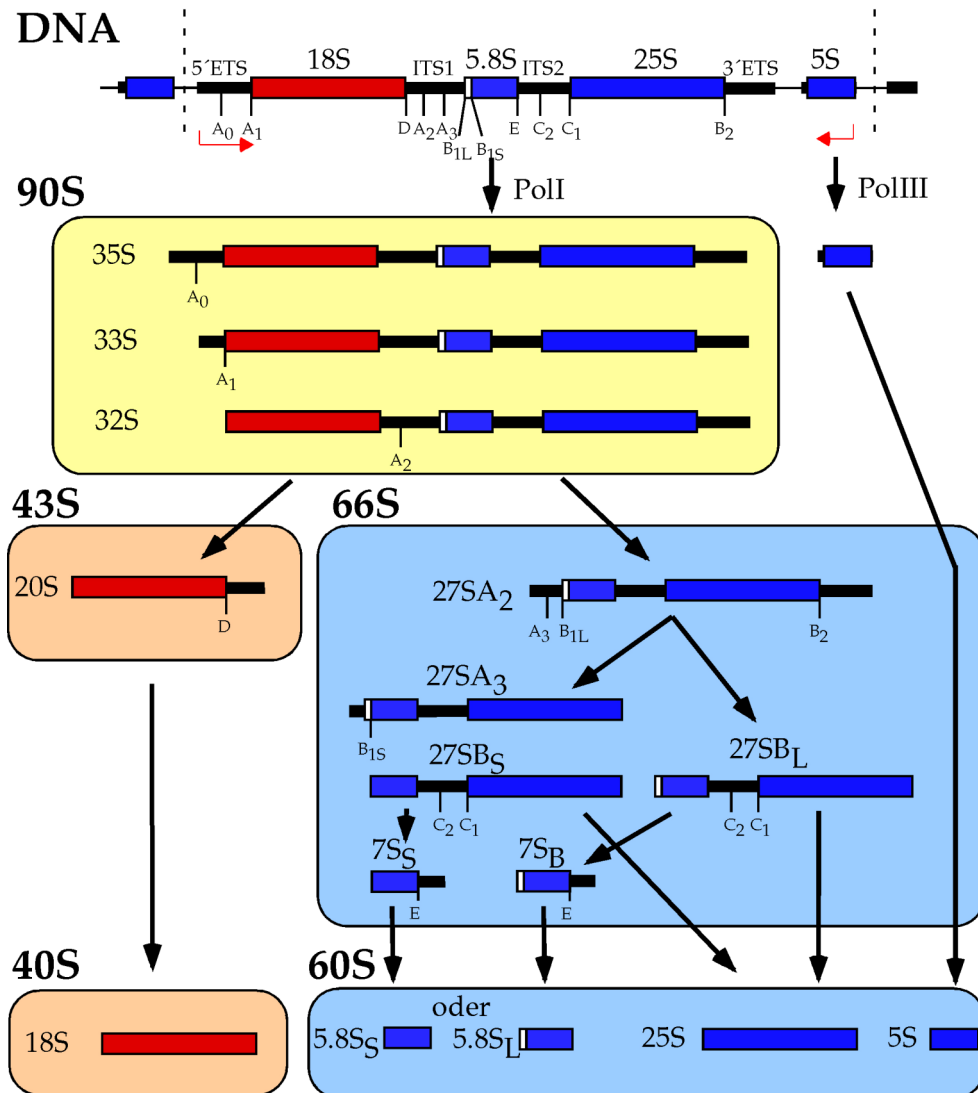


Abb. 4: Schematische und vereinfachte Darstellung der rRNA Prozessierung in *S. cerevisiae* (Baßler, 2001b).

Die rDNA liegt in 100- bis 200-facher Kopienzahl vor. Die Synthese der 5S rRNA erfolgt nach einem separaten Mechanismus über Polymerase III, gefolgt von einem 3'-Prozessierungsschritt. Die Biosynthese der 5.8S, 18S und 25S rRNA startet mit der Transkription des gemeinsamen 35S Precursors durch Polymerase I. Die 35S rRNA besteht neben der 5.8S, 18S und 25S rRNA auch aus den externen und internen transkribierten Spacerregionen (ETS, ITS). Innerhalb des 90S Komplexes erfolgen dann die nächsten Prozessierungsschritte. Nach den Schnitten an Position A₀ und A₁ teilt sich der 90S Komplex durch Schnitt an Position A₂ in den 43S und den 66S Komplex, wobei der 43S Komplex die 20S rRNA und der 66S rRNA Komplex die 27SA₂ rRNA enthält. Durch Prozessierung der 20S rRNA an Schnittstelle D wird die kleine ribosomale Untereinheit, der 40S Komplex mit der reifen 18S rRNA erhalten. Die weitere Prozessierung der 27SA₂ rRNA kann über zwei alternative Wege erfolgen. Circa 85% werden durch Schnitt an A₃ und B₂, gefolgt von B_{1L} weiterprozessiert. Die restlichen 15% der 27SA₂ rRNA werden an B_{1S} und B₂ geschnitten. Der letzte Prozessierungsschritt zum Erhalt des reifen 60S Komplexes läuft an den Positionen C₁, C₂ und E ab. Der reife 60S Komplex enthält die 5.8S_S, 5.8S_L, 25S und 5S rRNA.

Für eine detaillierte Beschreibung siehe Fatica & Tollervey (2002), Kressler *et al.* (1999), Lafontaine & Tollervey (2001) und Venema & Tollervey (1999).

Um neue am Export der ribosomalen 60S Untereinheit beteiligte Faktoren zu identifizieren, wurde eine Kollektion von temperatursensitiven Hefestämmen mit dem Rpl25p-GFP Reporter transformiert und bei restriktiver Temperatur auf eine Misslokalisierung des Reporterproteins untersucht (Gadal *et al.*, 2001a). Es konnten zahlreiche neue Faktoren isoliert und charakterisiert werden, die einen ribosomalen Exportdefekt der großen 60S Untereinheit (RIX-Mutanten) aufweisen. Der isolierte Faktor RIX5 wurde durch Gadal und Mitarbeiter (2001a) als Rpl10p identifiziert, einem ribosomalen Protein der 60S Untereinheit. Rpl10p interagiert direkt mit dem essentiellen zwischen Zellkern und Zytoplasma pendelnden Protein Nmd3p, das zwei NES tragende Sequenzbereiche im C-terminalen Bereich besitzt, die beide dem Konsensusmotiv der Leucin-reichen NES ähnlich sind. Sowohl Mutationen bzw. Deletionen der Nmd3p NES-Sequenzen, als auch Mutationen oder Inhibierung des Transportfaktors Xpo1p blockieren den Export des 60S Partikels. Ausserdem wird der Export von Nmd3p in einem LMB-sensitiven Hefestamm durch LMB inhibiert (Gadal *et al.*, 2001a; Ho *et al.*, 2000). Deshalb wird angenommen, dass der Export der 60S Untereinheit über den trimeren Xpo1p-RanGTP-Nmd3p Komplex vermittelt wird. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der Export der 40S Untereinheit ebenfalls Xpo1p abhängig verläuft (Milkereit *et al.*, 2002; Moy & Silver, 2002). Fraglich bleibt allerdings, ob es sich um die einzigen existierenden Export-Mechanismen für die 40S und 60S Partikel handelt. Eine höhere Anzahl an Transportrezeptoren kann den Transport eines sehr großen Substrates erleichtern (Ribbeck & Görlich, 2001; Ribbeck & Görlich, 2002), was eine Beteiligung weiterer Rezeptoren am Export der 60S Untereinheit wahrscheinlich macht. Desweiteren konnten Faktoren identifiziert werden, die sowohl am intranukleären Transport der prä-ribosomalen Partikel beteiligt sind, als auch eine Rolle in der Ribosomen-Biogenese spielen, Noc1p, Noc2p/Rix3p und Noc3p (Milkereit *et al.*, 2001). Zusätzlich wurden Proteine der frühen (Rlp7p/Rix9p: Gadal *et al.*, 2002), und der späten Ribosomen-Biogenese (Rix7p: Gadal *et al.*, 2001b) gefunden. Durch Milkereit und Mitarbeiter (2001) konnte gezeigt werden, dass zwei unterschiedliche dimere Noc-Komplexe, Noc1p/Noc2p und Noc2p/Noc3p, existieren. Der Noc1p/Noc2p-Komplex liegt assoziiert mit den 90S und 66S prä-ribosomalen Untereinheiten im Nukleolus vor, während der Noc2p/Noc3p-Komplex im Nukleoplasma lokalisiert und mit dem 66S Prä-Partikel assoziiert. Die Interaktion der Noc Proteine scheint essentiell für die intranukleäre Bewegung der ribosomalen Vorstufen zu sein und könnte dadurch einen wichtigen Bestandteil der Ribosomen-Biogenese darstellen (Milkereit *et al.*, 2001).

Zusätzliche Faktoren konnten durch Affinitätsaufreinigungen von Proteinen mit einer bekannten ribosomalen Funktion und der Analyse der assoziierten Proteine und RNAs identifiziert werden (Baßler *et al.*, 2001a; Fatica & Tollervey, 2002; Gavin *et al.*, 2002; Grandi *et al.*, 2002; Harnpicharnchai *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2002; Nissan *et al.*, 2002; Saveanu *et al.*, 2001).

7.3.4 Export von mRNA

Nicht alle nukleozytoplasmatischen Transportprozesse werden durch Vertreter der Importin- β -Familie und RanGTP vermittelt. Ein Beispiel hierfür ist der bereits beschriebene Re-Import von RanGDP durch Ntf2p. Ein weiteres wichtiges Beispiel ist der Export von mRNA. Hierbei zeigen die benötigten Transportfaktoren ebenfalls keine Bindung zu Ran und wandern Ran unabhängig zwischen Kern und Zytoplasma hin und her.

mRNAs werden im Zellkern transkribiert und nach mehreren Prozessierungs- und Modifizierungsschritten ins Zytoplasma exportiert, wo sie durch die Translation in Proteine übersetzt werden. Prozessierte und modifizierte mRNA wird assoziiert mit hnRNP-Proteinen (Proteine des heterogenen nukleären Ribonukleoprotein Partikels) als großer mRNP (mRNA enthaltender Ribonukleoprotein-Komplex) exportiert. Die Prozessierung der Vorstufen mRNA im Kern beinhaltet die 5'-Addition einer m⁷-G-Kappe, das Herausspleißen von Introns und die 3'-Polyadenylierung. Manche hnRNP-Proteine sind nur für bestimmte Prozessierungsschritte der mRNA notwendig und werden vor dem Export wieder abgelöst. Andere mRNA-bindende Proteine bleiben mit der mRNA assoziiert und bilden so zusammen mit der mRNA den mRNP-Exportkomplex. Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese Proteine eine aktive Funktion beim Export besitzen.

Unterschiedliche Studien wiesen Xpo1p eine Beteiligung am Export von mRNA zu. So misslokalisiert poly(A)⁺ mRNA in der temperatursensitiven Mutante *xpo1-1* bei restriktiver Temperatur (Stade *et al.*, 1997). In humanen Zellen akkumuliert poly(A)⁺ mRNA nach Zugabe von LMB nach längerer Inkubationszeit (Watanabe *et al.*, 1999). Allerdings waren Ergebnisse anderer Gruppen kontrovers. So konnten Neville und Mitarbeiter (1999) zeigen, dass in einem LMB-sensitiven Xpo1p-Hefestamm mRNA signifikant langsamer akkumuliert als ein Substrat mit Leucin-reicher NES. Dieser Befund wies auf eine eher indirekte Beteiligung von Xpo1p am mRNA-Export hin. Mikroinjektionsexperimente in *Xenopus* Oozyten Kernen ergaben ähnliche Ergebnisse. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Injektion von NES-Proteinen in den Kern zwar den Export von snRNA inhibiert, mRNA-Export allerdings keinen Defekt aufweist (Fischer *et al.*, 1995). Weitere Hinweise, dass der Export

von mRNA nicht über einen Importin- β -ähnlichen Rezeptor abläuft, kamen durch Untersuchungen der Beteiligung von RanGTP an diesem Prozess. Durch Depletionsexperimente des nukleären RanGTPs in *Xenopus* Oozyten Nuklei kann tRNA und snRNA-Export blockiert werden, während mRNA-Export keinen Defekt zeigt (Clouse *et al.*, 2001).

Über einen genetischen Ansatz in *S. cerevisiae* konnten erste Faktoren, die am mRNA-Export beteiligt sein könnten, identifiziert werden. So wurden temperatursensitive (ts) Hefestämme auf mRNA-Exportdefekte bei restriktiver Temperatur untersucht (Amberg *et al.*, 1992; Kadowaki *et al.*, 1994a; Kadowaki *et al.*, 1994b; Kadowaki *et al.*, 1992). Es konnten durch diese Ansätze einige für den Export von mRNA essentielle Proteine identifiziert werden. So wurden Nukleoporine, mRNA-bindende Proteine (bzw. RNA modifizierende Proteine), Karyopherine und andere Faktoren des Ran-Zyklus gefunden. Über einen genetischen "Screen" in Hefe mit der Mutante eines Nukleoporins, *nup85 Δ* , die einen starken mRNA-Export-Defekt zeigt, konnte Mex67p identifiziert werden (Segref *et al.*, 1997). Obwohl Mex67p nicht zur Familie der Importin- β -ähnlichen Rezeptoren gehört, zeigt es eine Lokalisierung an der Kernpore und bindet mRNA. Es konnte gezeigt werden, dass Mex67p direkt mit Mtr2p interagieren kann. Mtr2p wurde unabhängig von diesen Ergebnissen als eine möglicherweise am mRNA-Export beteiligte Komponente identifiziert (Kadowaki *et al.*, 1994a). Der dimere Komplex aus Mex67p und Mtr2p bindet sowohl mRNA als auch Nukleoporine (Santos-Rosa *et al.*, 1998; Sträßer *et al.*, 2000b). Die Analyse des Exports viraler RNA in höheren Zellen führte zur Identifizierung von TAP als mRNA-Exportfaktor (Grüter *et al.*, 1998). TAP zeigt Sequenzhomologie zu Mex67p, wandert zwischen Kern und Zytoplasma hin und her, und ist sowohl am NPC als auch im Nukleoplasma lokalisiert (Katahira *et al.*, 1999). Analog zur Interaktion von Mex67p-Mtr2p interagiert TAP mit p15, einem NTF2-Paralogen. Interessanterweise kann der TAP-p15-Komplex teilweise die Funktion des Mex67p-Mtr2p-Komplexes in Hefe übernehmen (Katahira *et al.*, 1999).

Weitere am mRNA-Export beteiligte Faktoren wurden über genetische oder biochemische Ansätze identifiziert. So wurde das essentielle, nukleäre Protein Yra1p als direkter Interaktionspartner von Mex67p identifiziert (Sträßer & Hurt, 2000a; Stutz *et al.*, 2000). Yra1p ist ein Mitglied der Familie der REF-Proteine (RNA-Export-Faktor-bindende Proteine), die von Hefe zu höheren Eukaryonten hoch konserviert sind (Stutz *et al.*, 2000) und es konnte gezeigt werden, dass Yra1p mit dem Mex67p-Mtr2p-Komplex interagieren kann. Während des Spleißprozesses der mRNA bindet Aly, das Maus Homolog von Yra1p,

an den mRNP-Komplex (Zhou *et al.*, 2000). Diese Bindung kommt über den nukleären Spleißfaktor Sub2p zustande (Luo *et al.*, 2001; Sträßer & Hurt, 2001). Das Homolog von Sub2p in höheren Eukaryonten ist UAP56 (Gatfield *et al.*, 2001). Die beiden beschriebenen Bindungen von Sub2p und Yra1p an Mex67p konkurrieren jedoch miteinander. So kann Mex67p-Mtr2p an Yra1p binden und dadurch Sub2p vor dem Export der mRNA aus dem mRNP-Partikel entfernen (Sträßer & Hurt, 2001). Sub2p und Yra1p spielen allerdings nicht nur eine Rolle im Export von gespleißter mRNA, sondern auch im Export von ungespleißter mRNA. Welche Erkennungssequenzen in gespleißter und ungespleißter mRNA die Bindung von Yra1p und Sub2p vermitteln ist allerdings noch nicht geklärt (Gatfield *et al.*, 2001; Reed & Hurt, 2002; Sträßer & Hurt, 2001). Vor kurzem konnte ein Zusammenhang zwischen dem Export von mRNA und der Transkription hergestellt werden (Sträßer *et al.*, 2002). Sträßer und Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, dass die beiden oben beschriebenen mRNA Export Faktoren Yra1p und Sub2p sowohl physikalisch als auch genetisch mit den Mitgliedern des THO-Komplexes, der eine Rolle in der Transkription spielt, interagieren. Der durch Yra1p, Sub2p und den Mitgliedern des THO-Komplexes gebildete Komplex wurde aufgrund seiner möglichen Kopplung der Transkription mit dem mRNA-Export als TREX-Komplex ("transcription/export") bezeichnet.

Weitere bereits identifizierte Faktoren des mRNA-Exports sind Npl3p, Dbp5p und Gle1p. Npl3p, das zwischen Nukleus und Zytoplasma hin und herpendelt, besitzt wahrscheinlich mehrere Rollen während des mRNA Exportes. So konnte gezeigt werden, dass Npl3p mit der RNA-Polymerase II interagieren kann und zusammen mit Yra1p während der Transkription an die mRNA rekrutiert wird (Lei *et al.*, 2001). Desweiteren könnte Npl3p eine Rolle bei der Polyadenylierung der mRNA spielen. Der Import von Npl3p wird wie bereits beschrieben über Mtr10p vermittelt (Lee *et al.*, 1996; Senger *et al.*, 1998; Singleton *et al.*, 1995).

Dbp5p ist eine ATP-abhängige Helikase, die auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore lokalisiert und dort an der Dissoziation des mRNP-Partikels beteiligt sein könnte. Nachdem der mRNP-Partikel durch Interaktionen des Mex67p-Mtr2p-Komplexes mit den "FG-Repeats" verschiedener Nukleoporine durch die Kernpore gebracht wurde, erfolgt die Termination der Translokation durch den Nup159p-Dbp5p-Gle1p-Komplex. Dies wird möglicherweise durch die Dissoziation des Mex67p-Mtr2p-Yra1p-mRNP-Komplexes hervorgerufen, die durch eine direkte Bindung von Dbp5p an Yra1p zustande kommen könnte. Mit der mRNA exportierte Proteine und die Transportfaktoren werden in den

Zellkern reimportiert. Die exportierte mRNA bindet im Zytoplasma an das Ribosom und steht dadurch bei der Translation zur Verfügung.

8. Ansätze zur Identifizierung neuer Exportsubstrate

Obwohl für das von Xpo1p erkannte, Leucin-reiche NES-Motiv, wie es sich in der PKI- und Rev-NES findet, ein Konsensusmotiv beschrieben wurde (Bogerd *et al.*, 1996), bleibt die Identifizierung von Exporterkennungssequenzen, die zum besseren Verständnis der Export-Mechanismen und einer möglichen dabei stattfindenden Regulation beitragen können, eine Herausforderung. Die Analyse des Exports und der beteiligten Exportsignale in der Hefe *S. cerevisiae* ist durch die kleine Größe der Zellen stark eingeschränkt. So sind Mikroinjektionsexperimente, wie sie in höheren Eukaryonten zur Untersuchung von Exportphänomenen benutzt werden, nicht möglich (Übersicht in Stauber, 2001). Alle bisher beschriebenen Systeme zur Untersuchung des nukleären Exports in *S. cerevisiae* zielen entweder auf die direkte Identifizierung beteiligter Transportfaktoren oder auf die nähere Charakterisierung definierter, bereits bekannter Sequenzen ab. Als erstes Beispiel sei hier die Untersuchung eines Transportsubstrates mit bekannter Lokalisierung in mutanten Exportin-Hefestämmen (z.B. *xpo1-1* Stade *et al.*, 1997 oder *cse1-2* Schröder *et al.*, 1999) genannt. Eine Misslokalisierung eines zytoplasmatischen GFP-Fusionsproteins in den Zellkern einer Exportin-Mutante zeigt eine Beteiligung des untersuchten Exportins am Export des Substrates. Andere Möglichkeiten zur Untersuchung des Exportes basieren auf der Verwendung eines Reporterproteins. Ein GFP-Fusionsprotein, das sowohl eine SV40-NLS, als auch eine Leucin-reiche NES trägt, zeigt eine zytoplasmatische Lokalisierung (Stade *et al.*, 1997). Dieses Protein wandert zwischen Zellkern und Zytoplasma ständig hin und her, reichert sich aber im Zytoplasma an, da der durch die NES vermittelte Export stärker ist, als der Import. Mit Hilfe des Reporterkonstrukts pNLS_{SV40}-NES_{PKI}-2xGFP (Taura *et al.*, 1998) kann nun in *S. cerevisiae* nach Proteinen gesucht werden, die eine Rolle im Export spielen. Hierfür werden Zellen mit diesem Konstrukt transformiert, durch Mutagenese temperatursensitive Mutanten erzeugt und auf eine nukleäre Misslokalisierung des Reporterproteins bei restriktiver Temperatur untersucht (Krebber H.; persönliche Mitteilung).

Eine andere Methode zur Suche nach neuen am Export beteiligter Faktoren benutzt ein modifiziertes, dem 2-Hybrid Verfahren ähnliches System, das auf dem von Taura und Mitarbeitern (1998) beschriebenen NLS_{SV40}-NES_{PKI}-2xGFP-Konstrukt basiert. Bei diesem

System wurde das Konstrukt mit einer transkriptionellen Aktivierungsdomäne und einer DNA-Bindungsdomäne anstelle von 2xGFP ergänzt. Zusätzlich enthält der Reporter Hefestamm ein Reportergen (z.B. *lacZ*) mit Bindungsstellen für die entsprechende DNA-Bindungsdomäne im Promotor. Sollte durch Mutagenese des transformierten Reporterstamms der NES-vermittelte Exportweg des Testkonstrukts zerstört sein, wird dieses über die NLS in den Zellkern importiert. Dort kommt es zu einer Interaktion mit dem Reportergen und dessen Transkription wird aktiviert. Der Nachweis einer erfolgten Transkription des Reportergens kann über eine Farbbassay erfolgen. Bei diesem wird ein farbloses Substrat (X-Gal) vom *lacZ*-Genprodukt β -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Als zusätzliche Kontrolle wird ein Markergen (z.B. *LEU2*) unter derselben transkriptionellen Kontrolle eingesetzt, das eine positive Selektion auf entsprechendem Medium erlaubt. Durch Analyse der Mutation können neue Komponenten des nukleären Exportweges von Leucin-reichen NES identifiziert werden (K. Stade, K. Weis; unveröffentlichte Ergebnisse). Durch die bisher beschriebenen Systeme können direkt am Export beteiligte Faktoren wie Transportine oder Nukleoporine identifiziert werden. Eine Identifizierung neuer Substrate ist allerdings nicht möglich.

Ein Ansatz zur Bestätigung einer NES-Domäne ist die Konstruktion eines Testplasmids, in das ein definiertes Fragment mit vermuteter NES-Aktivität eingebaut werden kann und dadurch den Export idealerweise wiederherstellt. Ein solches Plasmid wurde von Weis (2000) beschrieben. Dieses Plasmid enthält, ähnlich pNLS_{SV40}-NES_{PKI}-2xGFP (Taura *et al.*, 1998), eine NLS und zwei GFP-kodierende Sequenzen unter der Kontrolle des ADH-Promotors. Das durch dieses Konstrukt kodierte GFP-Fusionsprotein lokalisiert im Zellkern. Auf Plasmidebene befindet sich zwischen der NLS und den beiden GFP-Lozi eine Klonierungsstelle. In diese können NES-Fragmente einkloniert werden, um anschließend die Lokalisierung der neu erzeugten Fusionsproteine in der Zelle zu analysieren. Durch dieses von Weis (2000) beschriebene Testsystem können Sequenzdomänen aus Proteinen auf eine mögliche NES-Funktion untersucht werden und dadurch neue Export-Substrate identifiziert werden.

ZIEL DER ARBEIT

Ein Hauptmerkmal eukaryontischer Zellen ist die Kompartimentalisierung in unterschiedliche Organellen, die ein hohes Maß an Transport zwischen den Kompartimenten bedingt. Der nukleozytoplasmatische Transport vermittelt den durch die räumliche Trennung von Transkription und Translation notwendigen Austausch von Proteinen und RNAs zwischen Zellkern und Zytoplasma. Dabei werden die Transportsubstrate durch spezifische Erkennungssequenzen von löslichen Transportrezeptoren erkannt, gebunden und anschließend ins jeweilige Zielkompartiment transportiert. Obwohl gewisse Konsensusmotive für Nukleäre Lokalisierungssignale (NLS) und Nukleäre Exportsignale (NES) existieren, ist die Vorhersage neuer Transportsubstrate anhand der Primärsequenz aufgrund des geringen Grades der Konservierung problematisch.

Ziel dieser Arbeit war es, eine funktionelle Methode zur Identifizierung neuer Exportsignale in Proteinen zu entwickeln. Die Funktionalität der entwickelten Methode sollte mit Hilfe geeigneter Kontrollen überprüft werden. Durch Anwendung dieser neuen Methode sollten über Exportsignale neue nukleäre Exportsubstrate identifiziert und charakterisiert werden, um neue Einblicke in bisher unbekannte Exportmechanismen, die daran beteiligten Exportine und deren mögliche Regulation zu erhalten.

ERGEBNISSE

1. Ein funktioneller Assay für nukleäre Exportsignale (NES)

Die Zahl nachweislich aus dem Zellkern exportierter Proteine ist relativ klein (siehe Einleitung). Da diese Proteine eine wichtige Rolle bei der Regulation von zytoplasmatischen oder nukleären Prozessen (durch nukleäre oder zytoplasmatische Sequestrierung) und während der Biogenese von diversen RNA/Protein-Komplexen spielen, könnte allein die Identifizierung neuer Exportsubstrate solche Mechanismen aufdecken oder Details in bereits bekannten Mechanismen aufklären. Ziel dieser Arbeit war es, Exportsubstrate über deren NES zu identifizieren. Da die bekannten NESs auf Primärsequenzebene sehr degeneriert sind und daher eine Vorhersage einer NES-Funktion anhand der Primärsequenz sehr schwierig ist, erschien ein funktioneller Assay zur Identifizierung neuer NESs am vielversprechendsten. Als Basis eines solchen Assays wurde ein zwischen Zellkern und Zytoplasma hin und her pendelndes Protein gewählt, dessen Exportweg und insbesondere dessen NES bereits charakterisiert worden war, und bei dem eine Deletion der NES, neben der nukleären Akkumulation des Proteins, zu einem deutlichen Wachstumsphänotyp führte. Falls sowohl die zytoplasmatische Lokalisierung und das vegetative Wachstum durch die Fusion des NES-losen Proteins mit einer heterologen NES, wie zum Beispiel der PKI-NES oder der Rev-NES (siehe Einleitung), wiederhergestellt werden könnten, würde sich ein solches System auch zur Identifizierung neuer NES-Sequenzen eignen. Durch die Überprüfung von zwei Bedingungen, Lokalisierung und Wachstum, sollten Artefakte verringert werden können.

Bei dem Reporterprotein für den Assay fiel die Wahl auf Nmd3p, das eine essentielle Rolle beim nukleären Export der 60S ribosomalen Untereinheit spielt. Das Protein, das direkt mit der ribosomalen 60S Untereinheit assoziiert, wurde von Ho und Mitarbeitern (2000) und Gadäl und Mitarbeitern (2001a) als Exportsubstrat von Xpo1p beschrieben. Es interagiert mit Xpo1p über zwei C-terminale NESs (Abb. 5A), die essentiell für die Funktion von Nmd3p sind. So führt die Deletion der C-terminalen NES1 von Nmd3p zu einem starken Wachstumsdefekt. Werden beide NES-Signale (NES1+2) von Nmd3p deletiert, führt dies zu einer starken nukleären Akkumulation des GFP-Fusionsproteins und zum Zelltod (Gadäl *et al.*, 2001a; Ho *et al.*, 2000). Eine schematische Lokalisierung von exportkompetentem und exportdefizientem Nmd3p-eGFP ist in Abbildung 5C dargestellt. Es wurde gezeigt, dass die

Funktion von $\text{nmd3}\Delta\text{NES1+2p}$ durch Fusion mit der heterologen PKI-NES wiederhergestellt werden kann (Strauss, D.; persönliche Mitteilung). Nmd3p erfüllt somit alle Kriterien des angestrebten NES-Assays.

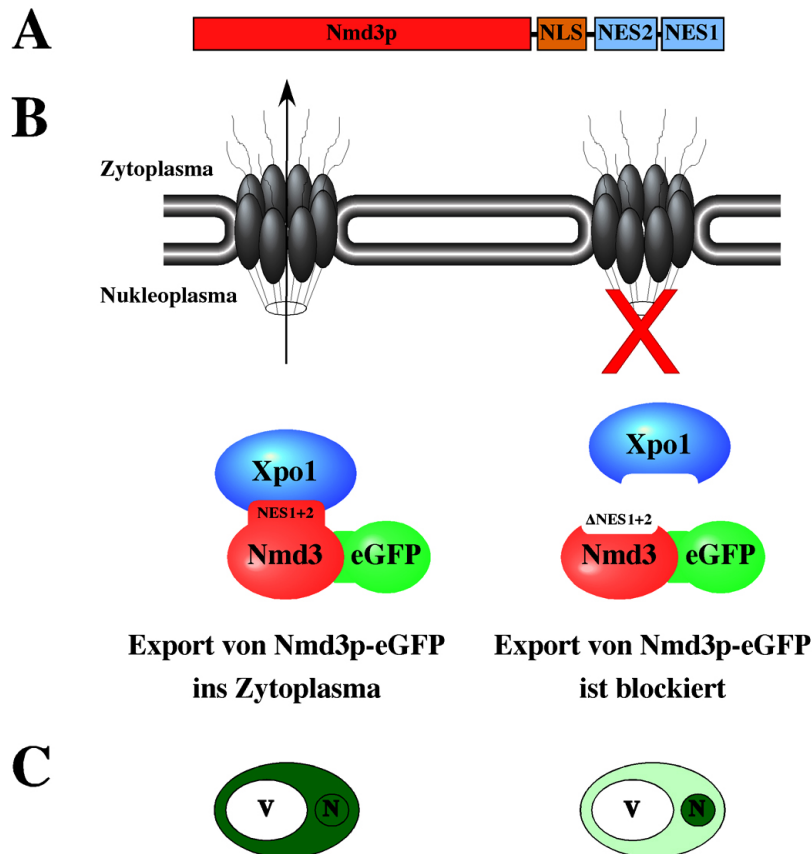


Abb. 5: Nmd3p erfüllt die Kriterien eines Proteins zur Konstruktion eines funktionellen NES-Assays.

(A) Schematische Darstellung der Domänenorganisation von Nmd3p. Nmd3p besitzt am C-terminalen Ende zwei NES-Sequenzen. Diese sind für den Export von Nmd3p über einen Xpo1p abhängigen Transportweg verantwortlich und für das Zellwachstum essentiell.

(B) Darstellung des Exports von Nmd3p-eGFP über Xpo1p. Nach der Deletion der beiden C-terminalen NES-Domänen von Nmd3p ist der Export des Proteins ins Zytoplasma blockiert.

(C) Schematische Darstellung der von Ho und Mitarbeitern (2000) und Gadal und Mitarbeitern (2001a) beschriebenen Lokalisierung von Nmd3p-eGFP und $\text{nmd3}\Delta\text{NES1+2p}$ -eGFP. Nmd3p-eGFP lokalisiert in der Wildtypsituation im Zytoplasma und Zellkern. Durch Deletion beider NES-Domänen am C-Terminus von Nmd3p akkumuliert das GFP-Fusionsprotein im Zellkern (V = Vakuole, N = Nukleus).

1.1 Konstruktion eines NES-Test Plasmids (NESTP)

In dem Assay sollten kodierende DNA-Sequenzen durch Fusion an das nicht funktionelle, nukleär akkumulierende Protein $\text{nmd3}\Delta\text{NES1+2p}$ -eGFP auf ihre Fähigkeit Export zu vermitteln untersucht werden. Durch Fusion einer NES-enthaltenden Sequenz sollte die Funktion und die zytoplasmatische Lokalisierung von $\text{nmd3}\Delta\text{NES1+2p}$ wiederhergestellt werden. Durch diese beiden Kriterien, zytoplasmatische Lokalisierung des Fusionsproteins und wiederhergestelltes Wachstum, können neue Exportsequenzen identifiziert werden. Um

Das generierte Plasmid pRS315-*nmd3*Δ*NES1+2-eGFP_LCS* (abgekürzt mit NESTP für NES-Test Plasmid; LCS: “library cloning site”) ist in Abbildung 6A dargestellt. Dieses Konstrukt trägt das NES1+2 deletierte offene Leseraster von *NMD3* unter Kontrolle des nativen *NMD3* Promotors (für genaue Beschreibung der Klonierung siehe Material & Methoden 1.3). Zur Lokalisierung des Proteins ist das offene Leseraster von *NMD3* C-terminal mit eGFP fusioniert. Eine systematische Durchmusterung der Hefeproteine im funktionellen NES-Assay sollte durch Klonierung von genomischen DNA-Fragmenten in das NES-Test Plasmid NESTP erreicht werden. Das NESTP enthält zu diesem Zweck eine “library cloning site” (LCS) am C-terminalen Ende der eGFP-Sequenz, direkt vor dem STOP-Codon von eGFP. Diese Position wurde gewählt, damit das durch das genomische Fragment kodierte eGFP-Fusionsprotein in der Zelle translatiert wird, auch wenn das genomische Fragment ein STOP-Codon oder eine Verschiebung des Leserasters enthält. Zur Bestätigung des durch die Deletion der NES-Domänen hervorgerufenen Wachstumsdefekt und zur Kontrolle der zellulären Lokalisierung des GFP-Fusionsproteins wurde das konstruierte NES-Test Plasmid NESTP in den “Shuffle” Stamm *Δnmd3 pURA3-NMD3* transformiert. Nach Überprüfung der Expression in Immunoblots mit einem GFP-Antikörper zeigten die erhaltenen Transformanten den erwarteten Funktionsverlust des Fusionsproteins auf 5'-FOA-haltigem Medium (5'-FOA: 5'-Fluoro-orotic-acid; 5'-FOA erlaubt eine negative Selektion gegen das *NMD3*-tragende *URA3*-Plasmid) (Abb. 6B). Zusätzlich wurde die zelluläre Lokalisierung des NES-Test eGFP-Fusionsproteins unter Normalbedingungen (siehe Material & Methoden 1.5) bestimmt. Das Protein zeigt im Gegensatz zur zytoplasmatischen Lokalisierung des Nmd3p-Wildtypproteins eine starke nukleäre Akkumulation im Kern (Abb. 6C).

1.2 Funktionstest des funktionellen NES-Assays

Vor der Durchführung einer systematischen Durchmusterung nach neuen NESs mittels des funktionellen NES-Assays musste geklärt werden, ob unterschiedliche NESs in der Lage sind, die Funktion der homologen NESs im neu konstruierten NES-Test Plasmid (NESTP) zu ersetzen. Hierzu wurden unterschiedliche kodierende Sequenzen in die zur Herstellung der NES-Bibliotheken vorgesehene Klonierungsstelle (“library cloning site” LCS) eingefügt und die Komplementationsfähigkeit des letalen *Δnmd3*-Phänotyps und die Lokalisierung des GFP-Fusionsproteins überprüft.

1.2.1 Funktionstest mit homologen NESs

Sowohl die einzelne NES1-, als auch beide NES-Domänen NES1+2 von Nmd3p (Abb. 5A) wurden in das NES-Test Plasmid NESTP kloniert (siehe hierzu Material & Methoden 1.2) und die so generierten Plasmide in den “Shuffle” Stamm $\Delta nmd3$ pURA3-NMD3 transformiert. Durch Wachstumsanalyse auf 5'-FOA-haltigem Medium und durch Untersuchung der Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine wurde überprüft, ob diese Sequenzen auch an der gewählten Klonierungsposition der NES-Bibliotheken als NESs funktionell sind.

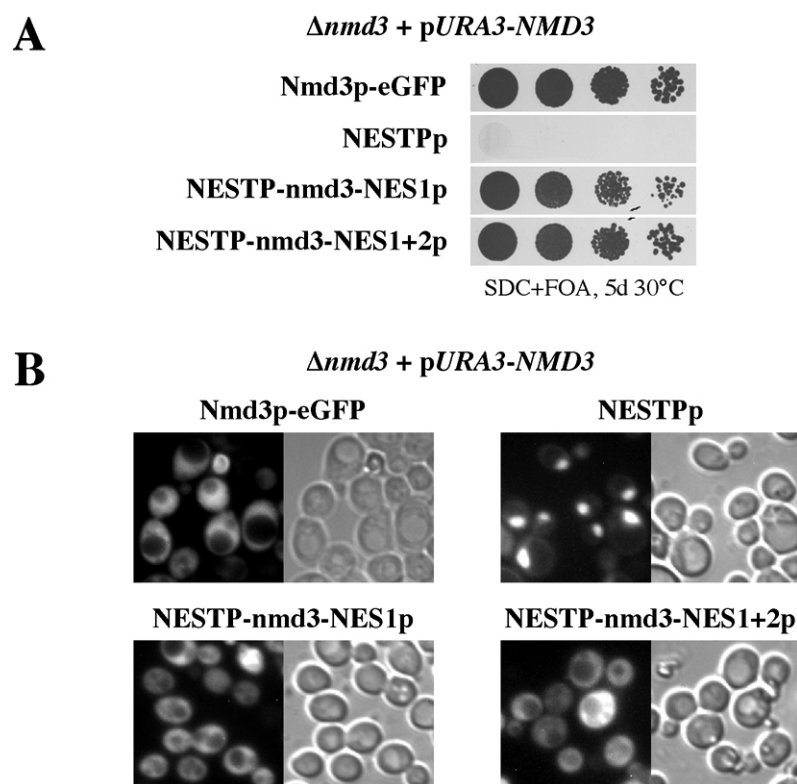


Abb. 7: Die homologen NES-Sequenzen aus Nmd3p sind im NES-Test System funktionell.

Der $\Delta nmd3$ pURA3-NMD3 Stamm wurde mit den Plasmiden pRS315-NMD3-eGFP, pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP_LCS (NESTP), NESTP-nmd3-NES1 und NESTP-nmd3-NES1+2 transformiert.

(A) Das Wachstum der Transformanten wurde auf SDC+FOA nach 5 Tagen Inkubation bei 30°C analysiert. Sowohl NESTP-nmd3-NES1p als auch NESTP-nmd3-NES1+2p komplementieren den $\Delta nmd3$ -Phänotyp vollständig.

(B) Die Fusionsproteine mit den homologen Nmd3p NES-Sequenzen (NESTP-nmd3-NES1p, NESTP-nmd3-NES1+2p) zeigen wie das Wildtyp-Fusionsprotein Nmd3p-eGFP eine zytoplasmatische Lokalisierung. Die zelluläre Verteilung der GFP-Fusionsproteine wurde unter Normalbedingungen (siehe Material & Methoden 1.5) mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Die durchgeführten Experimente ergaben, dass NESTP-nmd3-NES1p und NESTP-nmd3-NES1+2p den $\Delta nmd3$ Phänotyp ebenso gut komplementieren wie Nmd3p-eGFP (Abb. 7A). Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte eine wiederhergestellte zytoplasmatische

Lokalisierung der Fusionsproteine nachgewiesen werden (Abb. 7B). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die homologen NES-Domänen aus Nmd3p im NES-Test System funktionell sind.

1.2.2 Funktionstest mit heterologen NESs

Als Nächstes wurde geklärt, ob auch andere NES-Sequenzen, wie z.B. PKI-NES oder Rev-NES (siehe Einleitung), zu einer Wiederherstellung der *nmd3*ΔNES1+2 Funktion führen können (Abb. 8).

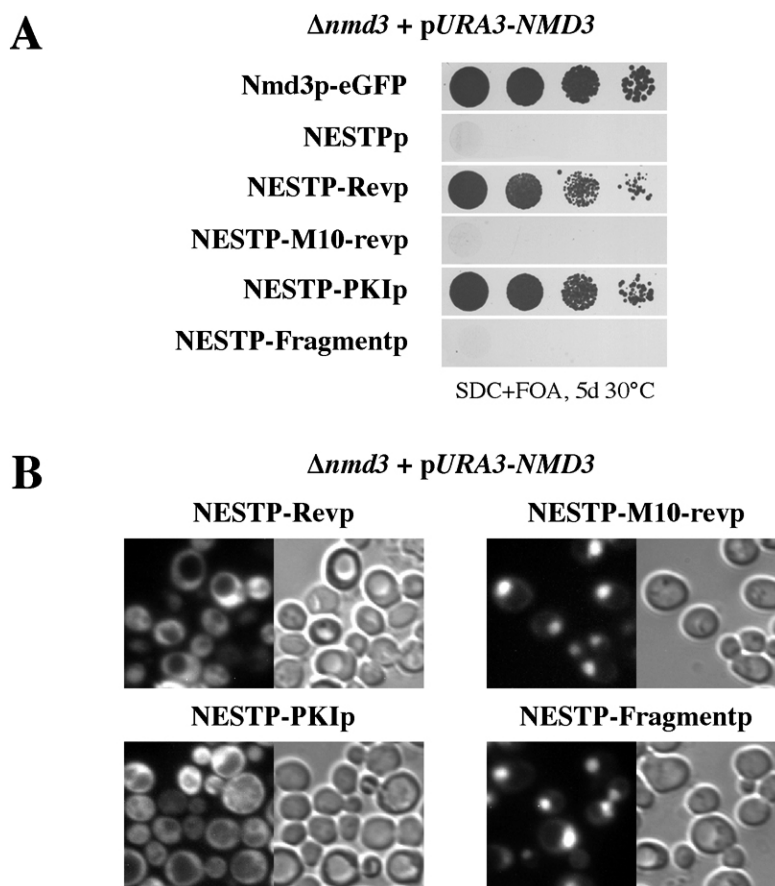


Abb. 8: Heterologe NES-Sequenzen sind im NES-Test System funktionell.

Nach Transformation der Plasmide pRS315-*NMD3-eGFP*, pRS315-*nmd3*ΔNES1+2-*eGFP_LCS* (NESTP), NESTP-Rev, NESTP-M10-rev, NESTP-PKI und NESTP-Fragment in den "Shuffle" Stamm *Δnmd3 pURA3-NMD3* wurde das Wachstum der Transformanten auf SDC+FOA und die zelluläre Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

(A) Zur Wachstumsanalyse wurden 1:10 Verdünnungen der jeweiligen Transformanten auf SDC+FOA getropft und 5 Tage bei 30°C inkubiert. Die Fusionen mit den funktionellen heterologen NES-Sequenzen (NESTP-Rev und NESTP-PKI) können den *Δnmd3* Phänotyp komplementieren. Im Gegensatz dazu können die mit NESTP-M10-rev und NESTP-Fragment transformierten Hefezellen nicht auf SDC+FOA anwachsen.

(B) Übereinstimmend mit der Wachstumsanalyse auf SDC+FOA zeigen die komplementierenden Fusionsproteine eine wiederhergestellte zytoplasmatische Lokalisierung. Die nicht komplementationsfähigen Proteine akkumulieren stark im Kern.

Hierzu wurden die Fusionskonstrukte NESTP-*Rev*, NESTP-*M10-rev*, NESTP-*PKI* und NESTP-*Fragment* generiert (siehe hierzu Material & Methoden 1.2) und in den “Shuffle” Stamm $\Delta nmd3$ pURA3-NMD3 transformiert. NESTP-*Fragment* enthält ein zufällig generiertes Fragment eines nichtkodierenden Bereichs genomischer DNA, das anstelle einer funktionellen NES in die LCS von NESTP eingefügt wurde. Die mutante Form der Rev-NES, M10-rev, enthält eine Mutation in der NES-Sequenz, die eine Bindung an Xpo1p blockiert und dadurch den Xpo1p vermittelten Export verhindert. Sowohl NESTP-*M10-rev*, als auch NESTP-*Fragment* dienten somit als Negativkontrollen um die Spezifität des Systems zu überprüfen. Tatsächlich können die NES-Sequenzen von PKI und Rev als Fusion mit NESTPp sowohl den $\Delta nmd3$ Phänotyp komplementieren, als auch die zytoplasmatische Lokalisierung des eGFP-Fusionsproteins wiederherstellen. Die Fusionen der mutierten Form der Rev-NES (NESTP-M10-revp) und des genomischen Fragments (NESTP-Fragmentp) mit NESTP sind dagegen wie erwartet nicht funktionell und zeigen eine starke nukleäre Akkumulation des GFP-Fusionsproteins. Die durchgeführten Kontrollexperimente zeigen, dass das NES-Test System, speziell das NES-Test Plasmid (NESTP), alle notwendigen Charakteristika zur Durchführung der Suche nach neuen NES-Substraten erfüllt und das System die notwendige Spezifität zur Charakterisierung von NES-Sequenzen aufweist.

1.2.3 NES-Proteindomänen im funktionellen NES-Assay

Zusätzlich zur Untersuchung bekannter NESs sollte vor der Durchführung des funktionellen NES-Assays untersucht werden, wie sich ganze Proteindomänen mit NES-Funktion im NES-Test System verhalten. Hierzu wurden folgende Plasmide generiert: NESTP-*mex67-C* und NESTP-*MTR2-FL* (Klonierung siehe Material & Methoden 1.2).

Mex67p und Mtr2p wurden aufgrund ihrer Beteiligung am mRNA-Export, einem Ran-unabhängigen Exportweg, ausgewählt. Von Mex67p wurde der C-terminale Bereich in NESTP kloniert. In diesem Bereich wurde von Segref und Mitarbeitern (1997) ein Rev-NES ähnlicher Sequenzabschnitt beschrieben. Von dem auch am mRNA-Exportkomplex beteiligten Protein Mtr2p wurde die FL-Aminosäuresequenz in die LCS-Klonierungsstelle von NESTP eingefügt. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse der im $\Delta nmd3$ pURA3-NMD3 “Shuffle” Stamm durchgeführten Wachstumsanalyse auf 5'-FOA-haltigem Medium (Abb. 9A) und der zellulären Lokalisierungsstudien der GFP-Fusionsproteine dargestellt (Abb. 9B).

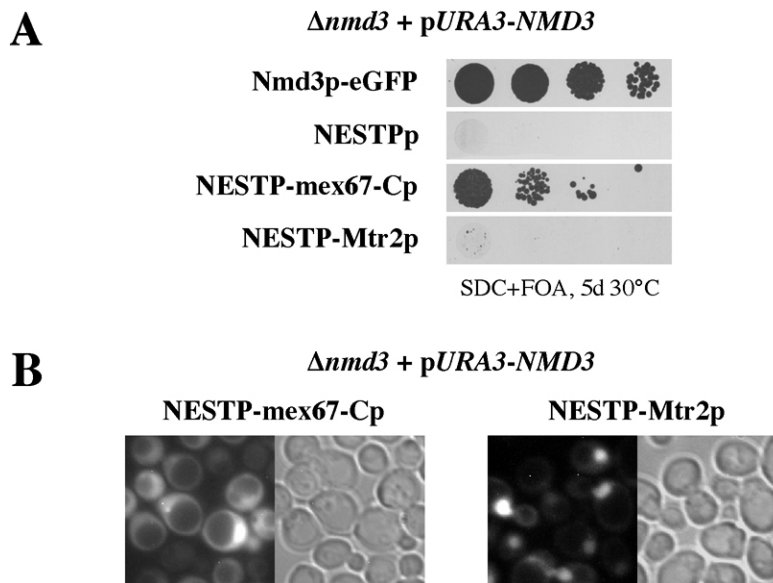


Abb. 9: Test verschiedener heterologer Proteindomänen im NES-Test System.

Der "Shuffle" Stamm $\Delta nmd3$ $pURA3-NMD3$ wurde mit den Plasmiden $pRS315-NMD3-eGFP$, $pRS315-nmd3\Delta NES1+2-eGFP_LCS$ (NESTP), NESTP-mex67-C und NESTP-MTR2-FL transformiert.

(A) Die Transformanten wurden 5 Tage auf SDC+FOA bei 30°C inkubiert. Die Fusion mit dem C-Terminus von Mex67p zeigt Wachstum auf SDC+FOA. Zellen die mit dem Konstrukt NESTP-MTR2 transformiert wurden können auf SDC+FOA nicht anwachsen.

(B) NESTP-mex67-Cp zeigt eine Wiederherstellung der zytoplasmatischen Lokalisierung, während NESTP-Mtr2p nukleäre Akkumulation aufweist. Die zelluläre Lokalisation wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Normalbedingungen (siehe Material & Methoden 1.5) analysiert.

NESTP-mex67-Cp zeigt bei den Lokalisierungsstudien eine Wiederherstellung der zytoplasmatischen Lokalisierung und die Fusion von mex67-C an NESTPp führt bei der Wachstumsanalyse auf 5'-FOA-haltigem Medium zur Komplementation des $\Delta nmd3$ -Phänotyps. Dies bedeutet, dass der C-terminale Bereich von Mex67p im NES-Test System die Funktion einer NES übernehmen kann. Anders verhält sich das zusammen mit Mex67p am Export von mRNA beteiligte Protein Mtr2p. Die Fusion des gesamten offenen Leserasters von *MTR2* mit NESTP kann den $\Delta nmd3$ Phänotyp nicht komplementieren. Das Fusionsprotein NESTP-Mtr2p zeigt ausserdem keine Wiederherstellung der zytoplasmatischen Lokalisierung, sondern akkumuliert genau wie NESTPp im Kern. Die Funktionalität von Mtr2p im Fusionsprotein NESTP-Mtr2p konnte durch die Komplementation des letalen $\Delta mtr2$ Phänotyps nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend konnte mit den durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass auch Proteine im NES-Assay funktionell sein können, die keine klassische NES besitzen oder an einem Ran-unabhängigen Exportweg beteiligt sind.

2. Funktionelles Screening nach NESs

2.1 Übersicht der Resultate

Nachdem die Funktionalität und Spezifität des entwickelten NES-Test Systems durch die durchgeführten Kontrollexperimente gezeigt werden konnte, wurden NES-Bibliotheken von genomischen DNA-Fragmenten im beschriebenen NESTP generiert, um eine schnelle Durchmusterung möglichst vieler Proteinsequenzen auf eine NES-Funktion zu ermöglichen. Es wurden zwei unterschiedliche Ansätze zur Herstellung der jeweiligen NES-Bibliotheken gewählt.

Zur Herstellung von NESB-0.75 (Zahl bezieht sich auf die durchschnittliche Größe der enthaltenen Fragmente in kb) wurden genomische DNA-Fragmente, die eine durchschnittliche Größe von ca. 900 bp besitzen, aus einer bereits beschriebenen 2-Hybrid Bibliothek (FRYL-“library”: Fromont-Racine *et al.*, 1997) gewonnen. Diese Ausgangs-DNA wurde benutzt, da mit der beschriebenen Bibliothek bereits sehr gute Ergebnisse in 2-Hybrid Analysen erzielt wurden und eine sehr geringe Redundanz der enthaltenen Fragmente vorliegt (nähere Beschreibung der Klonierung von NESB-0.75 in Material & Methoden 1.4.1).

Für NESB-2.0 (Zahl bezieht sich auf die durchschnittliche Größe der enthaltenen Fragmente in kb) wurden über einen partiellen Restriktionsverdau genomischer DNA mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* DNA-Fragmente generiert und diese in NESTP einkloniert (nähere Beschreibung der Klonierung von NESB-2.0 in Material & Methoden 1.4.2). Durch den partiellen Restriktionsverdau wurden auch sehr große genomische DNA-Fragmente gewonnen. Dadurch sollte erreicht werden, dass auch große Proteindomänen in einer korrekten Faltung an das NES-Test Protein NESTPp fusioniert vorliegen.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die hergestellten NES-Bibliotheken und das weitere experimentelle Vorgehen während der Durchführung des NES-Assays. Die Anzahl der bei der Amplifizierung der NES-Bibliotheken eingesetzten *E. coli* Transformanten wurde aufgrund der durchschnittlichen Fragmentgröße und der Prozenträte der fragmenttragenden Plasmide der jeweiligen Bibliothek berechnet. Es wurden so viele *E. coli* Einzeltransformanten zur Plasmidpräparation vereinigt, dass es durch die in der Bibliothek enthaltenen genomischen DNA-Fragmente theoretisch zu einer dreifachen Abdeckung des Hefegenoms kommt.

	NESB-0.75	NESB-2.0
Ausgangs-DNA	FRYL-Bibliothek	genomischen DNA
Vektor	pRS315- <i>nmd3ΔNES1+2-eGFP-LCS</i> (NESTP)	pRS315- <i>nmd3ΔNES1+2-eGFP-LCS</i> (NESTP)
Fragmentgröße	~ 750 bp	~ 2000 bp
Bei Amplifizierung der NES-Bibliothek (NESB) erhaltene <i>E. coli</i> Transformanten	270000	110000
fragmenttragende Plasmide	~ 92 %	~ 90 %
Transformation der NES-Bibliotheken in den “Shuffle” Stamm <i>Δnmd3</i> pURA- <i>NMD3</i> Erste Selektion auf den Plasmid-Marker der NES-Bibliotheken (SDC-Leu, 30°C)		
Anzahl der Transformanten in <i>Δnmd3</i> pURA3- <i>NMD3</i>	~ 193000	
Replika-Plattieren der erhaltenen Transformanten auf SDC+FOA Zweite Selektion auf komplementationsfähige Transformanten		
Komplementationsfähige Transformanten	1196	
Transformanten mit GFP-Signal	410	
Transformanten mit stabilem Fusionsprotein	103	
DNA-Isolierung und Rücktransformation in <i>Δnmd3</i> pURA3- <i>NMD3</i>		
Komplementationsfähige Transformanten	77	
Sequenzierung		
Bibliotheksplasmide, die eine Fusion mit einer Proteindomäne tragen	22	

Tab. 2: Übersicht der Durchführung des funktionellen NES-Assays zur Identifizierung neuer Exportsubstrate.

Die so gewonnenen NES-Bibliotheken NESB-0.75 und NESB-2.0 wurden in den "Shuffle" Stamm *Δnmd3* pURA3-NMD3 transformiert und insgesamt ca. 193000 Hefe-Einzelttransformanten durch Selektion auf den *LEU2*-Marker der Bibliotheksplasmide erhalten. Durch negative Selektion gegen das *NMD3* tragende *URA3*-Plasmid auf 5'-FOA-haltigem Medium wurde auf die Komplementationsfähigkeit der Bibliothekskonstrukte getestet. 1196 Transformanten konnten in Gegenwart von 5'-FOA anwachsen und erfüllten damit das erste Selektionskriterium des NES-Assays, nämlich die Komplementationsfähigkeit des letalen *Δnmd3* Phänotyps. Um ausschließen zu können, dass das Überleben der Hefetransformanten auf SDC+FOA durch eine Reversion oder Mutation des Hefestammes zustande gekommen ist, wurde anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie auf ein GFP-Signal des Bibliotheksfusionsproteins analysiert. Es wurden nur Transformanten weiter untersucht, die ein starkes GFP-Signal bei den Lokalisierungsexperimenten zeigten und bei einem erneuten Wachstumstest auf 5'-FOA-haltigem Medium anwachsen konnten. Von den so erhaltenen 410 Kandidaten wurde jeweils ein Komplett-Hefezellenextrakt hergestellt (Material & Methoden 2.1.6) und dieser in einer Immunoblot-Analyse auf ein stabiles GFP-Fusionsprotein mit Hilfe eines spezifischen GFP-Antikörpers untersucht. 103 Kandidaten zeigten ein stabiles GFP-Fusionsprotein in der Western Blot Analyse. Nach DNA-Isolation

der jeweiligen Bibliotheksplasmide aus den verbleibenden 103 Kandidaten und Rücktransformation der wiedergewonnenen DNA in den “Shuffle” Stamm *Δnmd3 pURA3-NMD3* wurde die Komplementationsfähigkeit der gefundenen NES-Bibliotheksplasmide erneut auf 5'-FOA-haltigem Medium getestet. So wurde von 77 Kandidaten das entsprechende Bibliotheksplasmid erhalten, das nach Retransformation in den “Shuffle” Stamm *Δnmd3 pURA3-NMD3* den *Δnmd3*-Phänotyp wiederum komplementieren kann. Die Aminosäuresequenzen der möglichen neuen NES-Substrat-Fragmente wurden durch DNA-Sequenzierung der genomischen Inserts identifiziert. Durch Analyse der so erhaltenen Sequenzdaten wurde die Lage der identifizierten Aminosäuresequenz im Hefegenom mit Hilfe der SGD-Datenbank bestimmt (siehe Material und Methoden 3.).

22 der sequenzierten Plasmide trugen eine “in frame” Fusion mit einem kodierenden Genabschnitt. Die restlichen Kandidaten zeigten entweder keine korrekte Fortsetzung des Leserasters von eGFP durch die gefundene Aminosäuresequenz oder trugen Fragmente aus intergenen Regionen, die nicht für Proteine von mehr als 100 Aminosäuren kodieren. In der Tabelle 3 sind die 22 Kandidaten, die eine im NES-Test System funktionelle NES-Sequenz aus einem der angegebenen ORFs beinhalten, zusammengefasst. Alle im funktionellen NES-Assay gefundenen Aminosäuresequenzen mit einer NES-Funktion finden sich im Anhang.

ORF	NESTP-FUSION (kDa)	GEFUNDENE DOMÄNE (AS)	<i>Δnmd3</i> -KOMPL.	LOK.	FUNKTION	LOK. DES GESAMT-PROTEINS	ΔORF
<i>RPN11</i>	90	288 - 307 (*)	++	cyt/n	Protein des 19S Regulationspartikels des Proteosoms; hat auch eine Funktion in der Elongation der RNA Polymerase II Transkription. Ähnlichkeit zum proteosomalen Protein Pad1p aus <i>S. pombe</i> .	nukleär und zytoplasmatisch	letal
<i>SCD5</i>	110	613 - 873 (*)	++	cyt	Suppressor der durch Mangel an Clathrin hervorgerufenen Letalität. Funktion in der Endozytose und kortikalen Actin Organisation.	zytoplasmatisch	letal
<i>RPL5</i>	92	103 - 197	++	cyt	Ribosomales Protein L5 (frühere Namen YL3, Rpl1p), das einzige 5S rRNA-assoziierte ribosomale Protein.	zytoplasmatisch	letal
<i>GFD1</i>	88	119 - 189 (*)	+	cyt	Protein assoziiert mit dem Kernporenkomplex; interagiert mit Gle1p, Nup42p und Dbp5p; mögliche Beteiligung am mRNA-Export.	nukleär und/oder Kernpore	lebensfähig
<i>NIP1</i>	85	130 - 149	++	cyt	Untereinheit des Translations-Initiations-Komplexes eIF3. Auch für den nukleären Import benötigt.	zytoplasmatisch	letal
<i>YOR280C</i>	85	225 - 267 (*)	++	cyt	Protein mit Ähnlichkeit zur N-terminalen Region der Dihydrofolat-reduktase aus <i>S. pombe</i> .	nukleär	lebensfähig

<i>BFR1</i>	90	404 – 471 (*)	++	cyt	Protein kann durch Überexpression die durch Brefeldin A induzierte Letalität supprimieren. Protein könnte am mRNA Metabolismus beteiligt sein.	zytoplasmatisch	lebensfähig
<i>CMK1</i>	90	336 – 447 (*)	-	nuk/c	Kalzium Calmodulin-abhängige Serin/Threonin Protein Kinase (CaM Kinase) Typ I.	zytoplasmatisch	lebensfähig
<i>YHR036W</i>	115	1 - 176...	+	cyt/n	Protein unbekannter Funktion.	unbekannt	letal
<i>YHR036W</i>	120	1 – 182...	++	cyt/n			
<i>YHR194W</i>	85	395 - 424	+/-	nuk/c	Protein unbekannter Funktion.	unbekannt	lebensfähig
<i>ZDS2</i>	105	174 – 348...	++	cyt	An der Regulation des transkriptionellen „Silencing“ der rDNA beteiligtes Protein.	unbekannt	lebensfähig
<i>TUP1</i>	90	396 – 434	-	nuk/c	Repressor der Transkription durch RNA Polymerase II. Bildet Komplex mit Ssn6p vor.	nukleär	lebensfähig
<i>MSB1</i>	150	635 – 809...	++	cyt	Protein mit einer möglichen Funktion im Aufbau der Polarität und der Knospenbildung	unbekannt	lebensfähig
<i>YGR287C</i>	85	94 - 125	+/-	nuk/c	Protein mit Ähnlichkeit zur α -D-Glukosidase (Maltase).	unbekannt	lebensfähig
<i>RSE1</i>	100	1236 - 1362	++	cyt/n	U2 snRNP-assoziiertes Protein, das am prä-mRNA Spleißprozess beteiligt ist. Indirekte Beteiligung am Transport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat.	nukleär	letal
<i>FAA1</i>	90	508 - 578	-	nuk/c	Langkettige Fettsäuren CoA Ligase (fatty acid activator 1)	zytoplasmatisch	lebensfähig
<i>YBR235W</i>	85	996 - 1047	+	cyt/n	Mitglied der Kationen-Chlorid-Kotransporter-Familie der Membran-transporter.	unspezifische Membran-lokalisierung	lebensfähig
<i>BUD6</i>	80	445 - 496	+/-	nuk/c	Für die bipolare Knospung benötigtes Protein.	bud neck	lebensfähig
<i>YDR063W</i>	90	117 – 150 (*)	-	nuk/c	Protein unbekannter Funktion	unbekannt	lebensfähig

Tab. 3: Durch den funktionellen NES-Assay identifizierte Proteindomänen mit einer möglichen NES-Funktion.

Angegeben ist die Komplementationfähigkeit des letalen *Anmd3* Phänotyps (*Anmd3*-Kompl.) durch die im NES-Assay gefundenen Bibliotheksplasmide (Stärke der Komplementation: ++ sehr gute - schlechte Komplementation) und die durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelte Lokalisierung des Fusionsproteins (Lok.). (Lokalisierungsangaben des Fusionsproteins: cyt: zytoplasmatische Lokalisierung, cyt/n: hauptsächlich zytoplasmatische Lokalisierung mit schwachem Anteil im Kern, nuk/c: nukleäre Akkumulation mit schwachem zytoplasmatischen Signal). Die Informationen „Funktion“, „Lokalisierung des Gesamtproteins“ und „ Δ ORF“ in dieser Tabelle sind der YPD-Datenbank (siehe Material & Methoden 3.) entnommen und beziehen sich auf das Gesamtprotein. (*) zeigt das native STOP-Codon in der im Bibliotheksplasmid gefundenen Domäne an. (...) bedeutet, dass durch die Sequenzierung das Ende des Fragments nicht identifiziert werden konnte.

2.2 Charakterisierung ausgewählter Kandidaten des NES-Assays

Fünf der in Tabelle 3 angegebenen Kandidaten wurden aufgrund der starken Komplementationsfähigkeit des letalen *Anmd3* Phänotyps bei Wachstumsanalysen auf 5'-FOA-haltigem Medium (Abb. 10) und der wiederhergestellten zytoplasmatischen Lokalisierung des GFP-Fusionsproteins (Abb. 11) zur näheren Charakterisierung ausgewählt. Ein weiteres Auswahlkriterium zur näheren Charakterisierung war eine als zytoplasmatische angegebene Lokalisierung des Gesamtproteins (YPD-Datenbank).

Als Kandidaten wurden ausgewählt:

NESTP-bfr1(404-471)p: Bfr1p ("Brefeldin A resistance": Jackson & Kepes, 1994), ein mit Polysomen und dem mRNP-Komplex assoziiertes Protein, das am mRNA-Metabolismus beteiligt sein könnte (Lang *et al.*, 2001).

NESTP-rpn11(288-307)p: Rpn11p (RPN11: "Regulatory particle Non-ATPase"), ein essentielles Protein, das im 19S Regulationspartikels des Proteosoms vorliegt (Ferdous *et al.*, 2001; Glickman *et al.*, 1998; Verma *et al.*, 2000).

NESTP-scd5(613-873)p: Scd5p ("Suppressor of clathrin deficiency"), ein essentielles Protein, dem eine Rolle im vesikulären Transport zugeschrieben wird (Nelson *et al.*, 1996). Nach neueren Studien ist Scd5p an der Organisation des corticalen Actins und an der Endozytose beteiligt (Chang *et al.*, 2002; Henry *et al.*, 2002).

NESTP-nip1(130-149)p: Der Translations-Initiationsfaktor Nip1p ist ein essentielles Protein, das am Aufbau des Translations-Initiationskomplexes eIF3 beteiligt ist (Greenberg *et al.*, 1998; Phan *et al.*, 2001; Valasek *et al.*, 2002). Es liegt assoziiert mit der kleinen ribosomalen 40S Untereinheit vor (Greenberg *et al.*, 1998). Interessanterweise wurde dieses Protein auch in einem genetischen "Screen" nach Proteinen, die am nukleären Import beteiligt sind, gefunden (Gu *et al.*, 1992).

NESTP-rpl5(103-197)p: Rpl5p ist das einzig bekannte ribosomale Protein in Hefe, das an 5S rRNA bindet (Deshmukh *et al.*, 1993; Nazar, 1979). Die 5S rRNA wird als einzige ribosomale RNA durch RNA Polymerase III transkribiert. Das derzeitige Modell für die Ribosomenbiogenese geht davon aus, dass die 5S rRNA und somit das 5S rRNA-bindende ribosomale Protein Rpl5p bereits ein Bestandteil des Prä-60S Partikels ist (Nissan *et al.*, 2002). Es ist bemerkenswert, dass in diesem NES-Komplementations-Assay, der auf dem mit der ribosomalen 60S Untereinheit assoziierten Protein Nmd3p basiert, ein anderes am 60S Partikel beteiligtes Protein, Rpl5p, gefunden wurde.

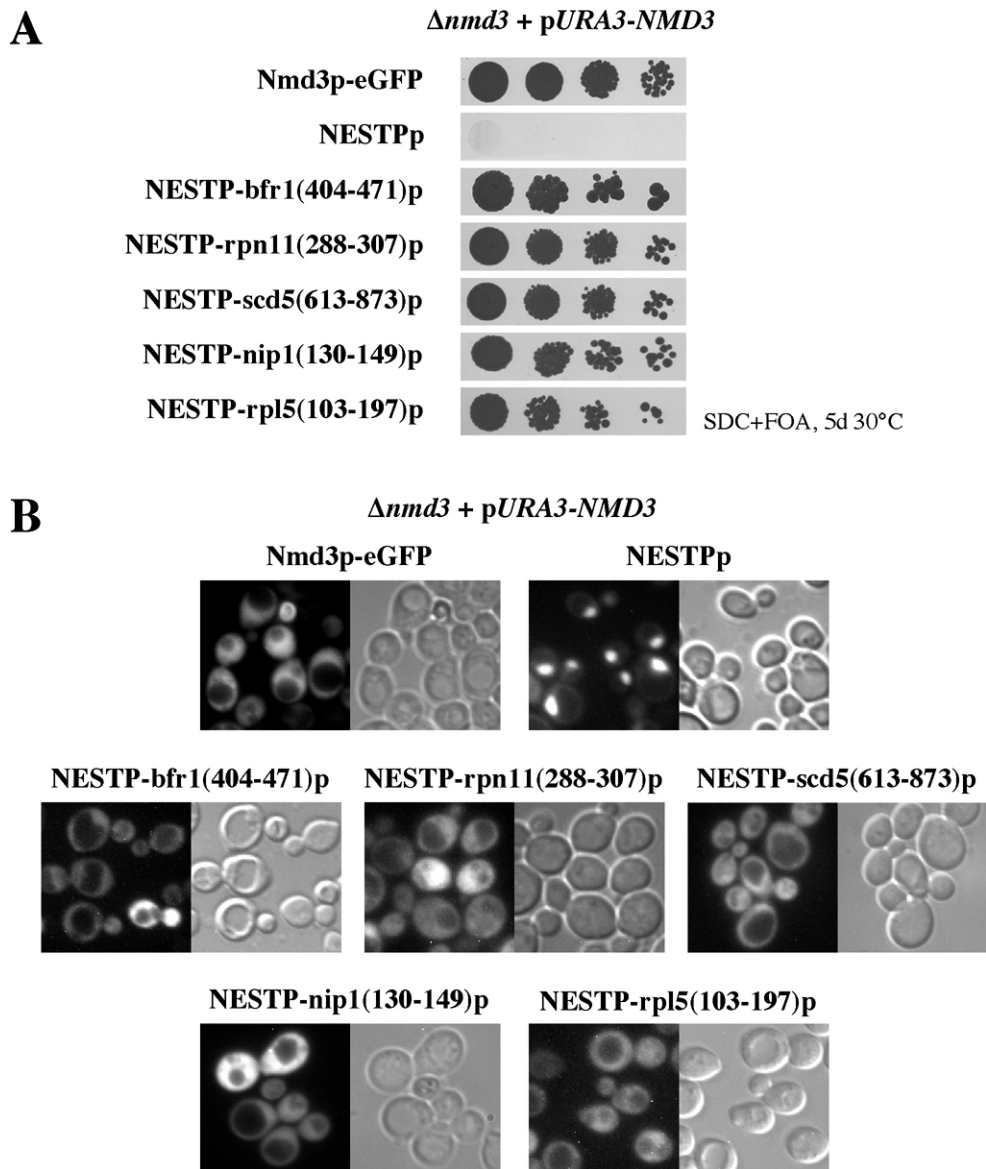


Abb. 10: Die fünf ausgewählten Kandidaten komplementieren den $\Delta nmd3$ -Phänotyp und die GFP-Fusionsproteine lokalisieren im Zytoplasma.

(A) Wachstumsanalyse der Kandidaten auf 5'-FOA-haltigem Medium im Vergleich zu den Kontrollen. Es wurden 1:10 Verdünnungen von Zellsuspensionen der Kandidaten NESTP-bfr1(404-471)p, NESTP-rpn11(288-307)p, NESTP-scd5(613-873)p und NESTP-rpl5(103-197)p sowie der Kontrollen Nmd3p-eGFP und NESTPp auf SDC+FOA Platten getropft und nach 5 Tagen Inkubation bei 30°C das Zellwachstum analysiert. Alle hier gezeigten NES-Bibliotheksplasmide komplementieren den $\Delta nmd3$ Phänotyp.

(B) Die zytoplasmatische Lokalisierung der Fusionsproteine wird durch die identifizierten Fragmente wieder hergestellt. Die zelluläre Verteilung der Kandidaten Proteine wurde im Vergleich zu Nmd3p-eGFP und NESTPp mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Normalbedingungen (siehe Material & Methoden 1.5) untersucht.

2.3 Exportmechanismen der ausgewählten NES-Kandidaten

Nachdem die Komplementationsfähigkeit der ausgewählten Kandidaten und die Wiederherstellung der zytoplasmatischen Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine gezeigt werden konnte, wurde untersucht, ob die gefundene NES-Aktivität der identifizierten Bibliotheksplasmide durch das Exportin der Leucin-reichen NES Xpo1p vermittelt wird. Es wurde sowohl die Lokalisierung der identifizierten NES-Kandidaten als auch der jeweiligen Volllängenproteine im LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm (Neville & Rosbash, 1999) und im isogenen *XPO1*-Wildtypstamm vor und nach LMB Behandlung (siehe Material & Methoden 2.1.9) analysiert. Es wurden folgende Plasmide generiert: pRS315-*GFP-BFR1*, pRS315-*RPN11-eGFP*, pNOPGFPA1L-*SCD5*, pRS315-*NIP1-eGFP* und pRS315-*RPL5-eGFP* (siehe Material & Methoden 1.2). Die Komplementationsfähigkeit der für essentielle Proteine kodierenden Plasmide wurde in den jeweiligen "Shuffle" Stämmen Δ *rpn11* pRS316-*RPN11*, Δ *scd5* pRS316-*SCD5*, Δ *nip1* pRS316-*NIP1* und Δ *rpl5* pRS316-*RPL5* (Material & Methoden 1.5) auf 5'-FOA-haltigem Medium nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Nach Durchführung der Leptomycin B (LMB) Experimente wurden die NES-Kandidaten und ihre entsprechenden Volllängenproteine in Xpo1p unabhängige und abhängige Transportsubstrate eingeteilt. Als Positivkontrolle diente das Konstrukt pNLS_{SV40}-NES_{PKI}-2GFP (Taura *et al.*, 1998), das nach kurzer Behandlungszeit mit LMB im LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm eine starke Akkumulation im Kern zeigt, da der durch Xpo1p vermittelte Export der NES_{PKI} blockiert wird. Die Lokalisierung des Kontrollkonstrukts ändert sich im isogenen *XPO1*-Wildtypstamm nach LMB Zugabe nicht (Abb. 11).

2.3.1 Xpo1p unabhängige Transportsubstrate

Die untersuchten Bibliothekskonstrukte NESTP-*bfr1*(404-471) und NESTP-*rpn11*(288-307) zeigen selbst nach 90 minütiger Behandlung mit LMB keine nukleäre Misslokalisierung im LMB-sensitiven *xpo1*-Hefestamm (Abb. 11). Die Lokalisierung der Fusionsproteine ändert sich im Vergleich zum isogenen *XPO1*-Wildtypstamm nicht. Die Bibliothekskonstrukte NESTP-*bfr1*(404-471) und NESTP-*rpn11*(288-307) scheinen daher keine Xpo1p Erkennungssequenz zu enthalten.

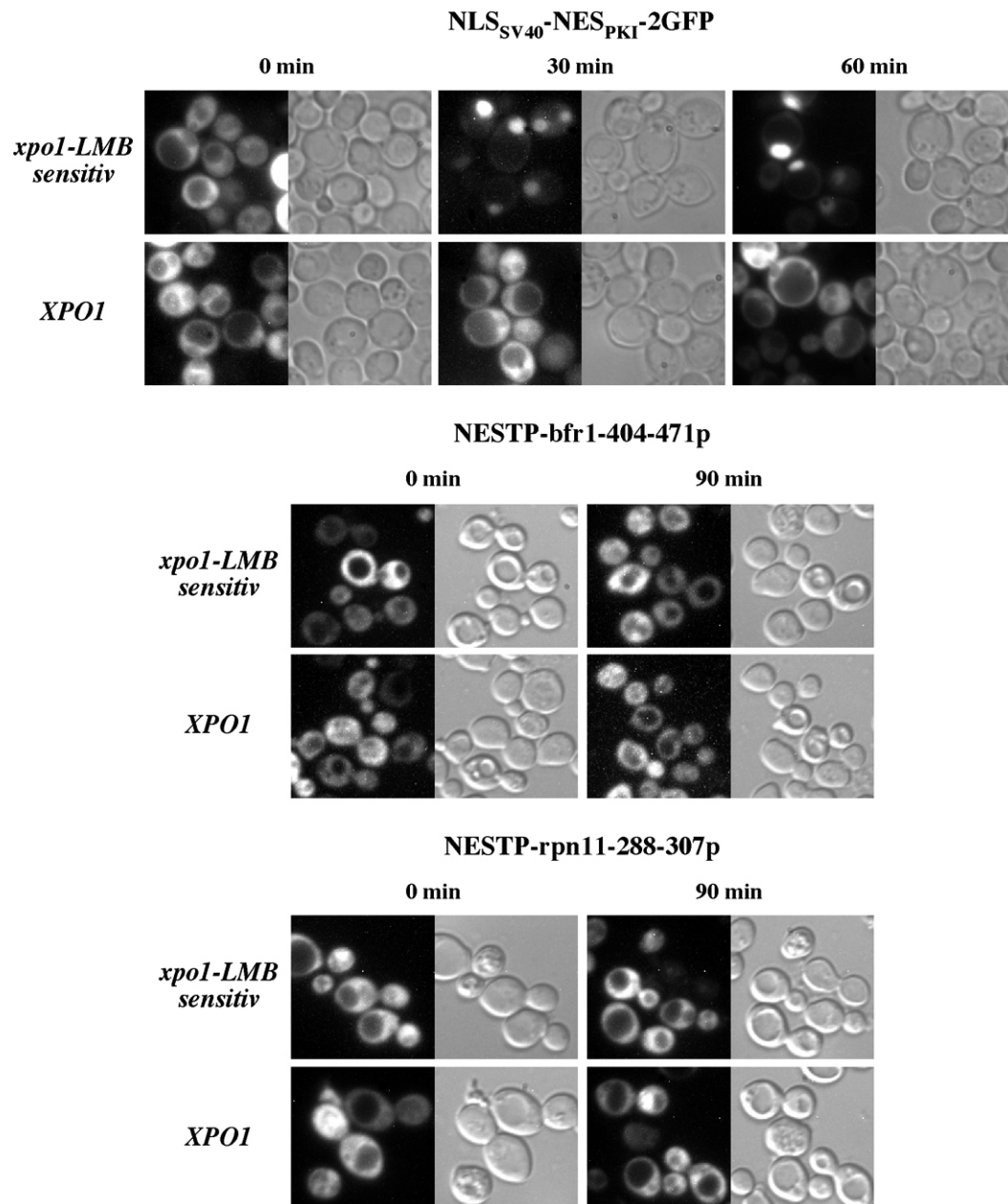


Abb. 11: Der Export der im NES-Assay identifizierten Bibliothekskonstrukte NESTP-bfr1(404-471)p und NESTP-rpn11(288-307)p wird nicht über Xpo1p vermittelt.

Die aus den Kandidaten des NES-Assay isolierten Bibliotheksplasmide NESTP-bfr1(404-471) und NESTP-rpn11(288-307) wurden in den LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm (Neville & Rosbash, 1999) und isogenen *XPO1*-Wildtypstamm transformiert. Als Kontrolle wurde im gleichen Stamm NLS_{SV40}-NES_{PKI}-2GFP (Taura *et al.*, 1998) untersucht. Nach Zugabe von LMB (100 ng/ml) zu den Kulturen wurde die Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie nach den angegebenen Zeiträumen detektiert. Beide Bibliothekskonstrukte zeigen keine Misslokalisierung im LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm selbst nach 90 Minuten Behandlung mit LMB, während das Kontrollplasmid bereits nach 30 Minuten stark im Zellkern akkumuliert.

Dies konnte durch Lokalisierungsanalyse der Vollängenkonstrukte pRS315-GFP-BFR1 und pRS315-RPN11-eGFP (siehe Material & Methoden 1.2) bestätigt werden. Die Fusionsproteine wurden ebenfalls im LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm (Neville & Rosbash, 1999) und im isogenen *XPO1*-Wildtypstamm exprimiert und anschließend die Lokalisierung vor und nach LMB-Behandlung der Zellen analysiert (Abb. 12).

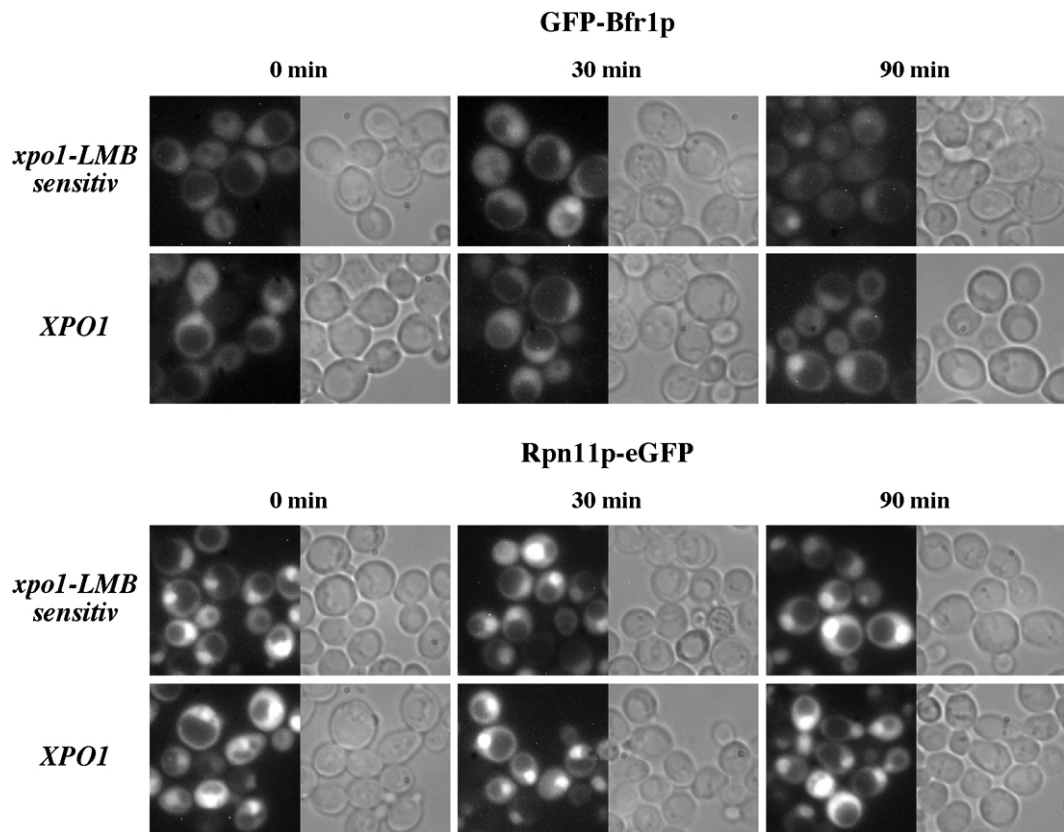


Abb. 12: Die Volllängenproteine Bfr1p und Rpn11p werden nicht durch Xpo1p exportiert.

GFP-Bfr1p und Rpn11p-eGFP wurden in einem LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm (Neville & Rosbash, 1999) und im isogenen *XPO1*-Wildtypstamm exprimiert. Zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde LMB (100 ng/ml) zur Kultur zugegeben. Anschließend wurde das GFP-Fluoreszenzsignal durch Mikroskopie nach den angegebenen Zeiträumen detektiert. Im LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm zeigen weder GFP-Bfr1p noch Rpn11p-eGFP auch nach 90 Minuten keine Veränderung der Lokalisierung des GFP-Fusionsproteins.

Der Export der GFP-fusionierten Volllängenproteine GFP-Bfr1p und Rpn11p-eGFP wird ebenfalls nicht durch Leptomycin B Zugabe blockiert, da sich auch nach 90 Minuten LMB-Behandlung des transformierten LMB-sensitiven *xpo1*-Stamms kein Unterschied in der Lokalisierung des jeweiligen Fusionsproteins im Vergleich zum isogenen *XPO1*-Wildtypstamm zeigt. Bei der Analyse der Lokalisierung der Fusionsproteine GFP-Bfr1p und Rpn11p-eGFP bestätigte sich die in der Literatur beschriebene zelluläre Verteilung der Proteine. Die Lokalisierung von Bfr1p wurde als zytoplasmatisch mit erhöhter Konzentration in der direkten Umgebung des Kerns beschrieben (Lang *et al.*, 2001) und die Lokalisierung des Rpn11p-eGFP-Fusionsproteins wird in der Literatur sowohl nukleär (Enenkel *et al.*, 1998), als auch zytoplasmatisch (Rinaldi *et al.*, 1998) angegeben. Durch die bereits in der Wildtypsituation vorhandene nukleäre Lokalisierung von Rpn11p-eGFP und die Anreicherung von GFP-Bfr1p in der nukleären Peripherie ist allerdings eine Beobachtung leichter Exportdefekte sehr schwierig.

Rpn11p-eGFP wurde zusätzlich in den bereits charakterisierten Exportin-Mutanten *Δmsn5*, *Δlos1* und *cse1-2* nach einem Exportdefekt untersucht (Abb. 13). Bei den nicht-essentiellen Exportinen, *MSN5* und *LOS1*, kann die Lokalisierung des Fusionsproteins direkt im jeweiligen Disruptionsstamm analysiert werden, um einen Exportdefekt nachzuweisen (*Δmsn5*: EUROSCARF, *Δlos1*: Simos *et al.*, 1996).

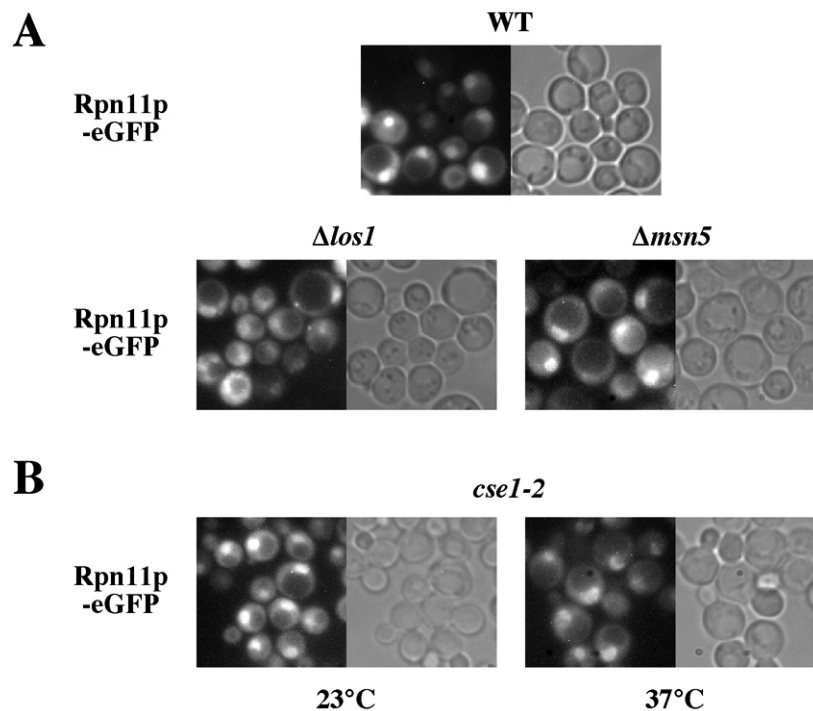


Abb. 13: Rpn11p-eGFP zeigt keine Misslokalisierung in Disruptions- oder temperatursensitiven Stämmen bekannter Exportine.

(A) Rpn11p-eGFP wurde in einem Wildtypstamm und in den Disruptionstämmen *Δlos1* (Simos *et al.*, 1996) und *Δmsn5* (EUROSCARF) exprimiert. Im Vergleich zur Wildtypsituation kommt es zu keinem Unterschied in der Lokalisierung des Fusionsproteins.

(B) Rpn11p-eGFP wurde in temperatursensitiven *cse1-2* (Schröder *et al.*, 1999) Zellen exprimiert und die Lokalisierung des Fusionsproteins bei 23°C und nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Es kommt zu keiner Misslokalisierung des GFP-Fusionsproteins.

Bei dem essentiellen Exportin *CSE1* muss eine konditionelle Mutante benutzt werden. Der Stamm *cse1-2* (Schröder *et al.*, 1999) zeigt bei einer restriktiven Temperatur von 37°C eine nukleäre Misslokalisierung des bekannten *CSE1* Exportsubstrates Importin- α und kann daher als Exportinmutante bei restriktiver Temperatur verwendet werden.

Rpn11p-eGFP misslokalisiert in keiner der getesteten Exportinmutanten *Δmsn5*, *Δlos1* und *cse1-2* (Abb. 13). Allerdings tritt auch hier das Problem auf, dass durch die bereits in der Wildtypsituation vorhandene nukleäre Lokalisierung leichte Exportdefekte nicht analysiert werden können. Ob und über welchen Exportweg Rpn11p aus dem Kern transportiert wird, bleibt somit unklar.

2.3.2 *Xpo1p* abhängige Transportsubstrate

Die drei Bibliothekskonstrukte NESTP-*scd5*(613-873), NESTP-*nip1*(130-149) und NESTP-*rpl5*(103-197) zeigen bereits nach 10 Minuten LMB-Behandlung im LMB-sensitiven *xpo1*-Hefestamm eine starke nukleäre Akkumulation, wobei sich die Lokalisierung im isogenen *XPO1*-Wildtypstamm nicht ändert (Abb. 14).

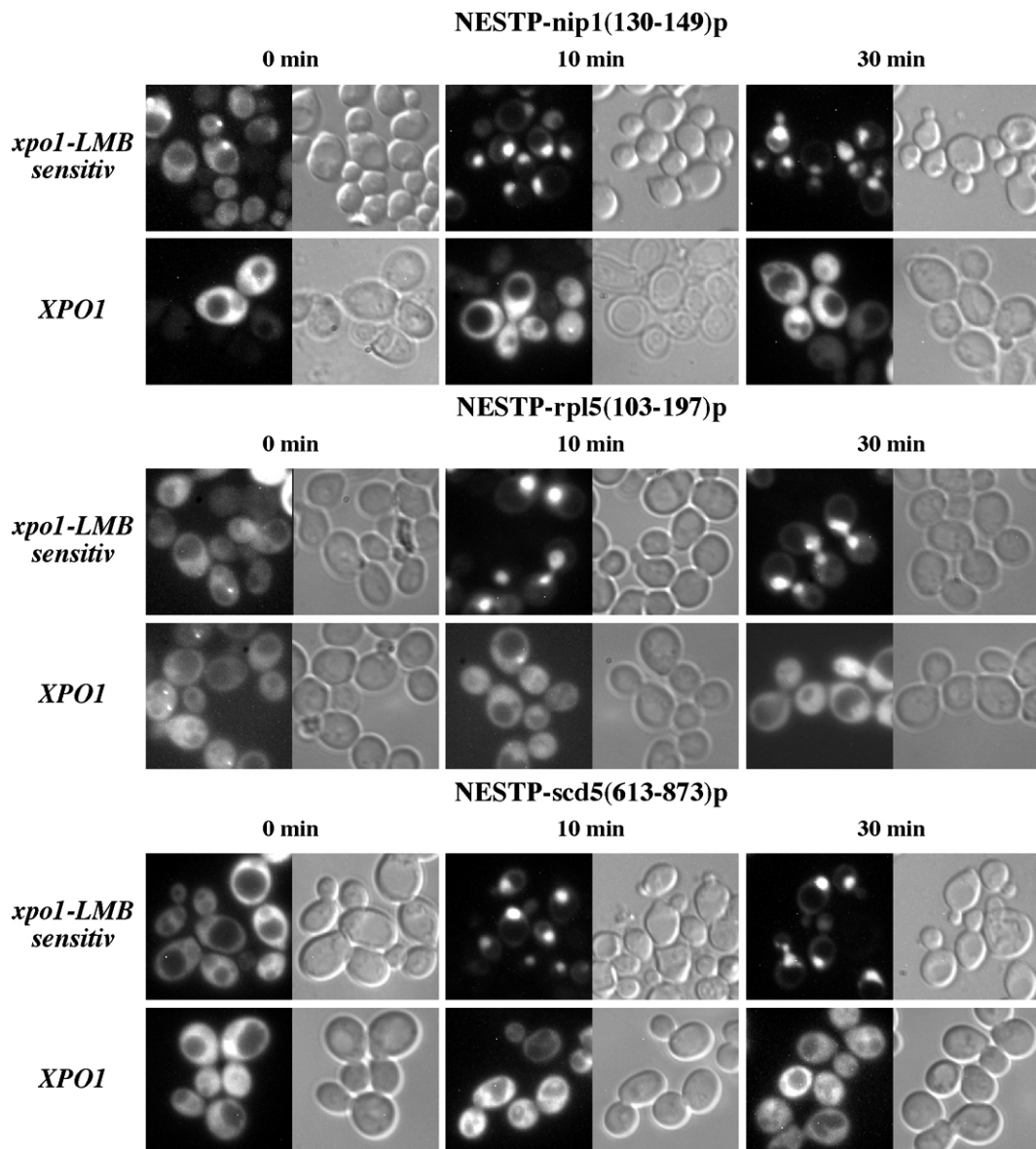


Abb. 14: Der Export der im NES-Assay identifizierten Bibliothekskonstrukte NESTP-*nip1*(130-149)p, NESTP-*rpl5*(103-197)p und NESTP-*scd5*(613-873)p ist *Xpo1p* abhängig.

Die isolierten Bibliotheksplasmide NESTP-*nip1*(130-149), NESTP-*rpl5*(103-197) und NESTP-*scd5*(613-873) wurden in den LMB sensitiven *xpo1*-Stamm (Neville & Rosbash, 1999) und den isogenen *XPO1*-Wildtypstamm transformiert. Nach Zugabe von LMB (100 ng/ml) zu den Kulturen wurde die Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie nach den angegebenen Zeiträumen detektiert. Die drei Bibliothekskonstrukte zeigen bereits nach 10 Minuten Behandlung mit LMB eine starke Misslokalisierung im LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm, während sich die Lokalisierung der Fusionsproteine im isogenen *XPO1*-Wildtypstamm auch nach LMB Zugabe nicht ändert.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass die identifizierten Bibliothekskonstrukte NESTP-nip1(130-149)p, NESTP-rpl5(103-197)p und NESTP-scd5(613-873)p eine Xpo1p abhängige Exportsequenz beinhalten.

Zusätzlich wurde überprüft, ob diese Sequenzabschnitte auch in den entsprechenden Vollängenproteine als NES funktionell sind und einen Xpo1p abhängigen Exportweg vermitteln können. Hierfür wurde die Lokalisierung der Vollängenkonstrukte pNOPGFPA1L-SCD5, pRS315-NIP1-eGFP und pRS315-RPL5-eGFP im LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm und im isogenen *XPO1*-Wildtypstamm analysiert. Die Fusionsproteine GFP-Scd5p, Nip1p-eGFP und Rpl5p-eGFP lokalisieren in der Wildtypsituation zytoplasmatisch. Wobei wie in Abbildung 15 zu sehen ist, Nip1p-eGFP und Rpl5p-eGFP exklusiv im Zytoplasma lokalisieren. Nach Zugabe von LMB akkumulieren alle hier getesteten GFP-Fusionen der Vollängenproteine im LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm bereits nach 10 Minuten stark im Kern. Im isogenen *XPO1*-Wildtyp kommt es auch nach Zugabe von LMB zu keiner Veränderung der Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine (Abb. 15).

Durch die durchgeführten Experimente konnte somit gezeigt werden, dass Nip1p-eGFP, Rpl5p-eGFP und GFP-Scd5p durch einen Xpo1p abhängigen Transportweg exportiert werden. Die jeweiligen Erkennungssequenzen für Xpo1p liegen dabei vermutlich in den im NES-Assay gefundenen Sequenzabschnitten der Proteine. Für GFP-Scd5p werden diese Resultate zusätzlich durch eine in der Literatur beschriebene 2-Hybrid Interaktion von Scd5p mit Xpo1p bestätigt (Ito *et al.*, 2001). Darüberhinaus konnten durch diese Experimente die in der YPD-Datenbank (siehe Material & Methoden 3) beschriebenen zellulären Verteilungen der Vollängenproteine bestätigt werden.

Rpl5p wurde aus den gefundenen Xpo1p abhängigen Transportsubstraten zur näheren Charakterisierung ausgewählt, da es neben Nmd3p einen weiteren Adapter für den Export der ribosomalen 60S Untereinheit darstellen könnte. Unterstützt wird diese Theorie durch die Diskussion in der Literatur, dass bei sehr großen Exportsubstraten die Exportrate durch mehrere Exportsignale erhöht werden kann (Ribbeck & Görlich, 2001). Rpl5p wäre das erste ribosomale Protein, das über ein Exportsignal einen direkten Kontakt zwischen dem 60S Partikel und dem Exportfaktor Xpo1p herstellen könnte.

Um eine Beteiligung von Rpl5p am Export der 60S Untereinheit nachzuweisen und zu analysieren, sollte die im NES-Assay gefundene Exportsequenz von Rpl5p im Folgenden näher charakterisiert werden.

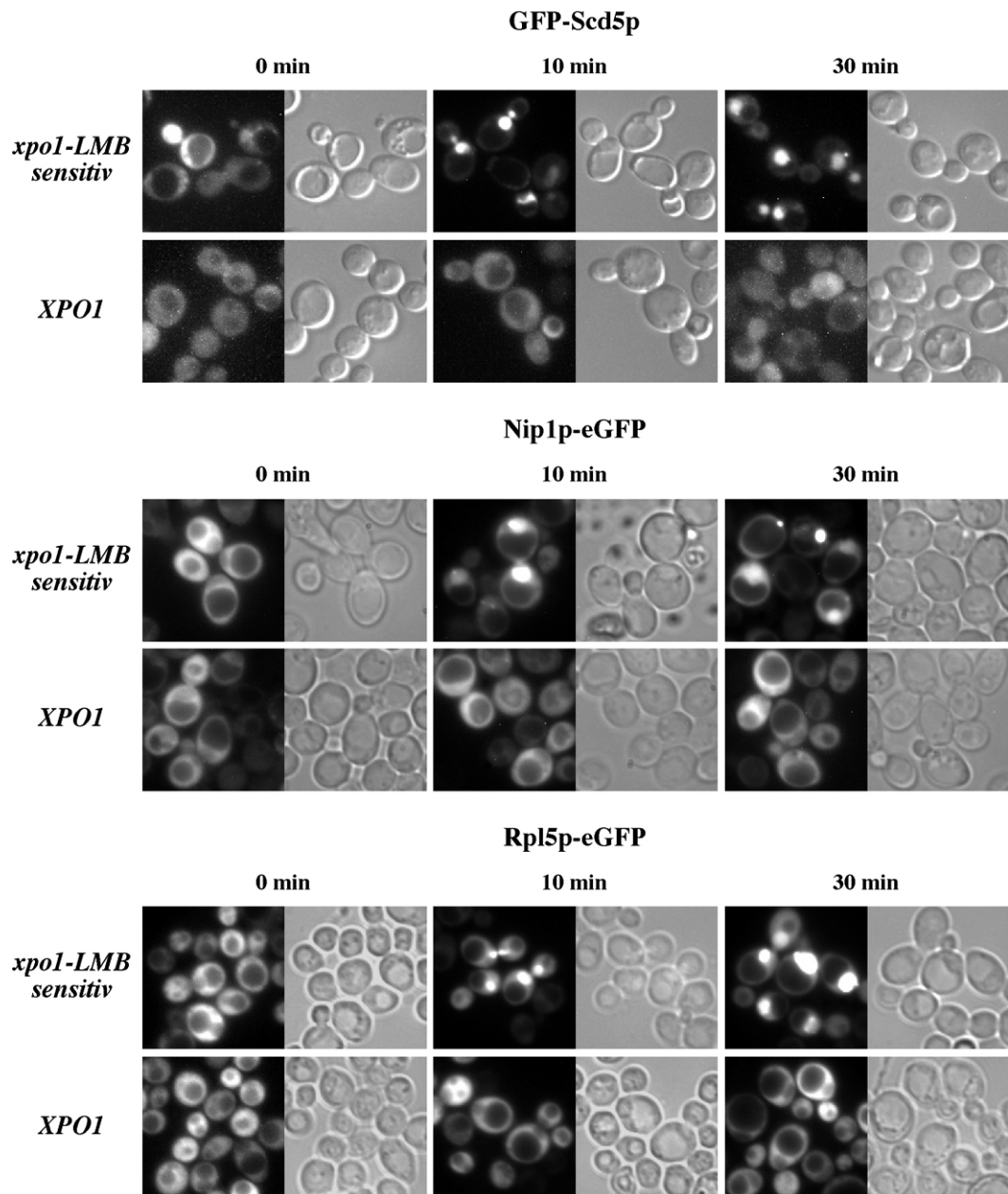


Abb. 15: Der Export von Scd5p, Nip1p und Rpl5p ist ebenfalls Xpo1p abhängig.

Zur Untersuchung des Xpo1p abhängigen Transportweges der Volllängenproteine wurden GFP-Scd5p, Nip1p-eGFP und Rpl5p-eGFP in dem LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm (Neville & Rosbash, 1999) und dem isogenen *XPO1*-Wildtypstamm exprimiert. Nach Zugabe von LMB (100 ng/ml) zur Kultur wurde das GFP-Fluoreszenzsignal durch Mikroskopie nach den angegebenen Zeiträumen detektiert. Im LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm zeigen alle Volllängenproteine GFP-Scd5p, Nip1p-eGFP noch Rpl5p-eGFP bereits nach 10 Minuten eine starke Akkumulation des Fusionsproteins im Zellkern.

2.4 RPL5

2.4.1 *rpl5-ts*-Mutationen zeigen einen 60S-Exportdefekt

Das ribosomale Protein Rpl5p bindet an 5S rRNA und der gebildete 5SrRNP assoziiert mit der ribosomalen 60S Untereinheit (Deshmukh *et al.*, 1995; Nissan *et al.*, 2002). Temperatursensitive Mutanten von Rpl5p sollten deshalb einen Exportdefekt der ribosomalen 60S Untereinheit besitzen, wobei der Export der 40S Untereinheit nicht beeinflusst werden sollte. Um dies zu untersuchen wurde die Lokalisierung der jeweiligen Reporterproteine Rpl25p-eGFP (60S Untereinheit; Hurt *et al.*, 1999) und Rps3p-eGFP (40S Untereinheit; Milkereit *et al.*, 2002) in temperatursensitiven *rpl5-ts* Stämmen (Deshmukh *et al.*, 1995) bei permissiver und restriktiver Temperatur analysiert (Abb. 16B).

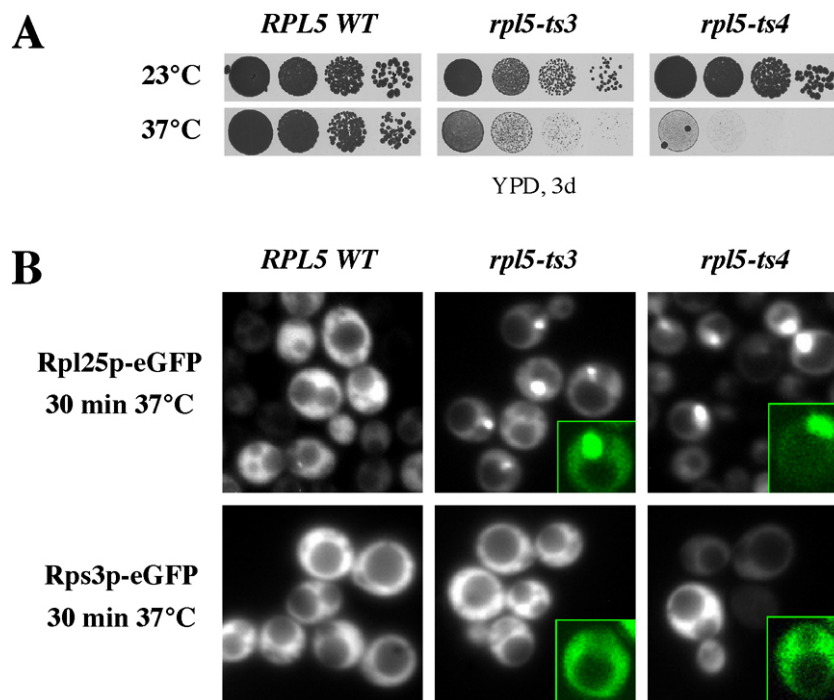


Abb. 16: Die ts-Mutanten von Rpl5p zeigen bei restriktiver Temperatur einen starken ribosomalen Exportdefekt der großen Untereinheit 60S, während der 40S-Export nicht beeinträchtigt ist.

(A) Wachstumseigenschaften der *rpl5-ts*-Mutanten im Vergleich mit dem Wildtypstamm bei restriktiver Temperatur. Die verwendeten Stämme wurden von Deshmukh und Mitarbeitern (1995) beschrieben. Eine Zellsuspension der Stämme wurde in einer 1:10 Verdünnungsreihe auf YPD getropft und 3 Tage bei 23°C bzw. 37°C inkubiert. Bei restriktiver Temperatur zeigen die *rpl5-ts*-Mutanten den beschriebenen Wachstumsdefekt.

(B) Lokalisierungsexperimente der Ribosomenexport-Reporterproteine (40S: Rps3p; 60S: Rpl25p). Die ts-Hefestämme und der entsprechende Wildtypstamm wurden mit pRS313-*RPL25-eGFP* bzw. pRS316-*RPS3-eGFP* transformiert und nach der von Gadai und Mitarbeitern (2001a) beschriebenen Methode analysiert. Beide ts-Mutanten zeigen eine starke Akkumulation von Rpl25p-eGFP im Nukleolus (kleine Bilder zeigen Konfokalmikroskopie-Bilder). Der Export der 40S Untereinheit wird dagegen durch die *rpl5-ts* Mutationen nicht beeinträchtigt.

Beide Reporterproteine werden zusätzlich zum Wildtyp-Protein in die jeweilige ribosomale Untereinheit eingebaut und können somit als visuelle Marker für den Export der ribosomalen Untereinheiten eingesetzt werden (Gadal *et al.*, 2001a; Hurt *et al.*, 1999; Milkereit *et al.*, 2002; siehe auch Einleitung 7.3.3). Eine Wachstumsanalyse bei permissiver und restriktiver Temperatur auf YPD-Medium bestätigte den von Deshmukh und Mitarbeitern (1995) beschriebenen Wachstumsdefekt der temperatursensitiven *rpl5*-Mutantenstämme (Abb. 16A). Lokalisierungstudien beider Reporterproteine der ribosomalen Untereinheiten (40S: Rps3p-eGFP; 60S: Rpl25p-eGFP) bei restriktiver Temperatur ergaben in beiden untersuchten *rpl5-ts* Mutanten eine nukleoläre Akkumulation des 60S Reporterproteins Rpl25p-eGFP. Die zytoplasmatische Lokalisierung des 40S Reporterproteins Rps3p-eGFP ändert sich dagegen durch die Inkubation der Zellen bei 37°C nicht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die *rpl5-ts* Mutationen Defekte im Export der großen ribosomalen 60S Untereinheit hervorrufen, während der Export der 40S Untereinheit nicht beeinträchtigt ist. Die den temperatursensitiven Wachstumsphänotyp hervorrufenden Mutationen in Rpl5p liegen allerdings nicht in der im NES-Komplementations Assay identifizierten Domäne.

2.4.2 Rpl5p-eGFP akkumuliert in *nup49-ts*-Zellen

Durch Lokalisierungsexperimente im LMB-sensitiven *xpo1*-Hefestamm konnte gezeigt werden, dass sowohl das Bibliothekskonstrukt NESTP-rpl5(103-197)p als auch das Volllängenprotein Rpl5p-eGFP durch eine Blockierung des Xpo1p vermittelten Exports im Zellkern akkumuliert (siehe Ergebnisse 2.3.2). Ob der Export von Rpl5p direkt durch die identifizierte NES vermittelt wird konnte durch die Lokalisierungsexperimente des Bibliothekskonstrukts und des Gesamtproteins nicht geklärt werden. Um zusätzlich zu den LMB-Experimenten ein generelles Hin- und Herwandern von Rpl5p zwischen Kern und Zytoplasma nachzuweisen, wurde die Lokalisierung von Rpl5p-eGFP in einem temperatursensitiven Stamm, der eine Mutation im Nukleoporin *NUP49* trägt (Doye *et al.*, 1994), analysiert. Das zwischen Zellkern und Zytoplasma pendelnde ribosomale Reporterprotein Rpl25p-eGFP (siehe oben) zeigt in dem *nup49-313 ts*-Hefestamm einen Exportdefekt bei der restriktiven Temperatur von 37°C und akkumuliert im Zellkern (Hurt *et al.*, 1999). Rpl25p-eGFP wurde deshalb als Positivkontrolle benutzt.

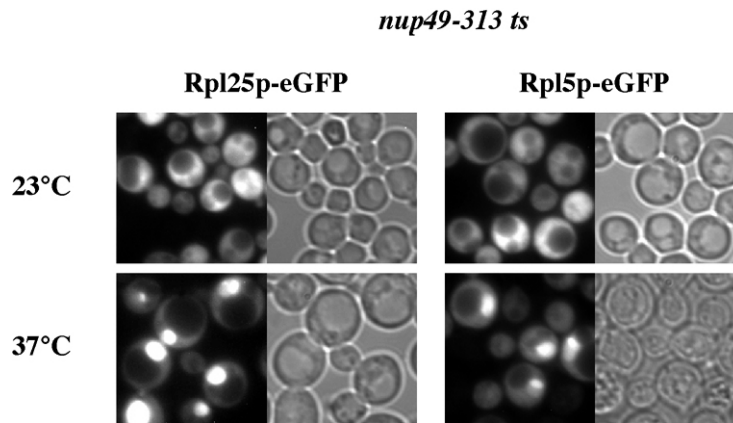


Abb. 17: Die *nup49-313 ts* temperatursensitive (ts) Mutante akkumuliert Rpl5p-eGFP bei restriktiver Temperatur im Kern.

Rpl5p-eGFP und Rpl25p-eGFP wurden in *nup49-313 ts* (Doye *et al.*, 1994) Zellen exprimiert und die Lokalisierung des GFP-Fusionsproteins bei 23°C und nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Rpl25p-eGFP wurde als Positivkontrolle benutzt (Hurt *et al.*, 1999). Sowohl Rpl5p-eGFP, als auch Rpl25p-eGFP als Positivkontrolle zeigen bei restriktiver Temperatur eine starke nukleäre Akkumulation im Kern.

Die zelluläre Verteilung des Rpl5p-eGFP und des Rpl25p-eGFP Fusionsproteins wurde im *nup49-313 ts*-Hefestamm bei permissiver und restriktiver Temperatur analysiert (Abb. 17). Wie Rpl25p-eGFP zeigt auch Rpl5p-eGFP eine starke nukleäre Akkumulation bei restriktiver Temperatur. Es kann dadurch zusätzlich zu den LMB-Experimenten gezeigt werden, dass der Export von Rpl5p-eGFP in *nup49-313 ts* bei restriktiver Temperatur blockiert ist. Allerdings kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Exportdefekt von Rpl5p durch die Blockierung des Exports des ribosomalen 60S Partikels hervorgerufen wird.

2.4.3 Einschränkung der NES in Rpl5p

Die im NES-Assay gefundene Aminosäuresequenz (AS 103-197) von Rpl5p, die eine NES-Aktivität aufweist, ist relativ lang. Daher sollte dieser Sequenzbereich weiter eingegrenzt werden, um die minimale NES-Domäne zu definieren. Es wurden Deletionen der identifizierten NES-Domäne (AS 103-197) von Rpl5p erzeugt und im NES-Assay auf Komplementationsfähigkeit des letalen *Δnmd3*-Phänotyps und auf eine Wiederherstellung der zytoplasmatischen Lokalisierung getestet. Alle generierten NESTP-*rpl5(ΔS)* Konstrukte sind in Abbildung 19 schematisch dargestellt. Die angefertigten Plasmide wurden in den "Shuffle" Stamm *Δnmd3 pURA3-NMD3* transformiert und sowohl Wachstumsanalysen auf 5'-FOA-haltigem Medium, als auch Lokalisierungsstudien der GFP-Fusionsproteine durchgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 18 dargestellt. Bei diesen Untersuchungen führt ein Verlust der NES-Funktion des eingefügten

Fragments zu einem Funktionsverlust des Fusionsproteins im NES-Assay und zu einer starken Akkumulation des eGFP-Fusionsproteins im Kern. Durch Wachstumsanalysen der generierten Transformanten auf 5'-FOA-haltigem Medium (Abb. 18A) und Analyse der zellulären Verteilung der eGFP-Fusionsproteine konnte der minimale im NES-Assay funktionelle Aminosäurebereich innerhalb von Rpl5p bestimmt werden.

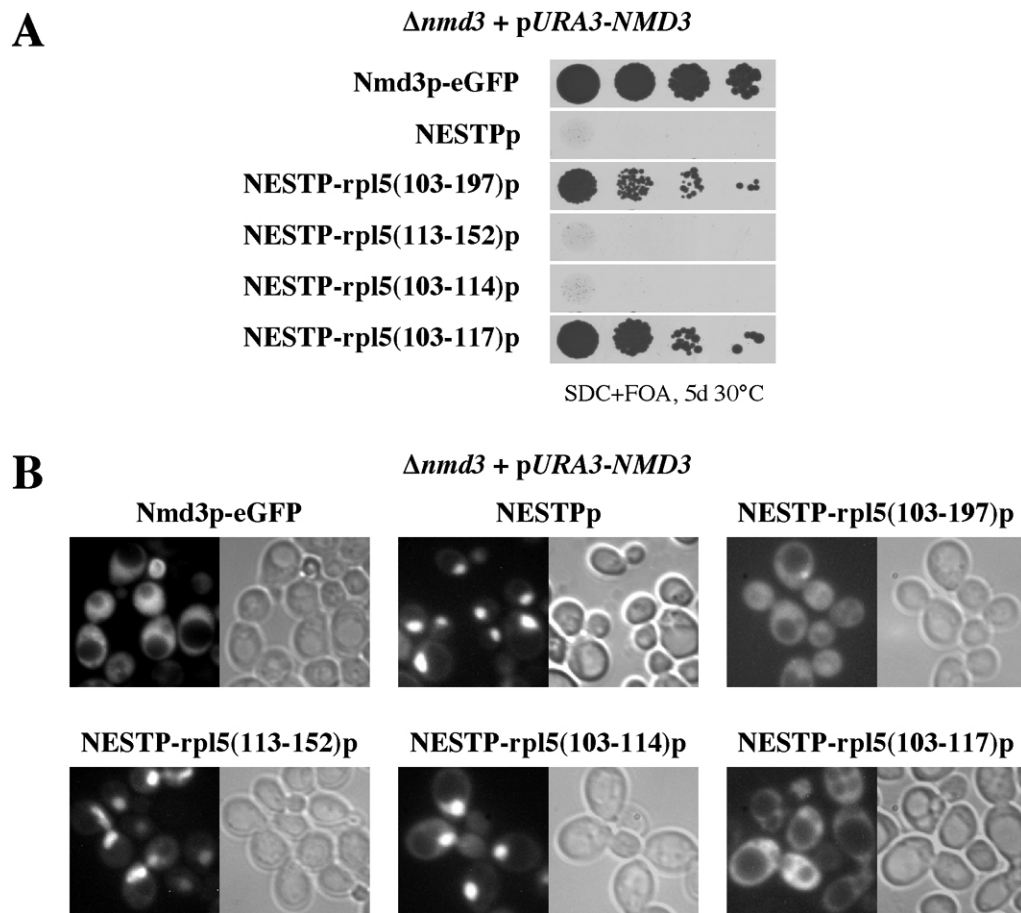


Abb. 18: Das kleinste im NES-Assay funktionelle Fragment aus Rpl5p ist AS 103-117.

(A) Verschiedene Domänen von Rpl5p wurden mit *nmd3ΔNES1+2-eGFP* fusioniert und in den "Shuffle" Stamm *Δnmd3* p*URA3-NMD3* transformiert. Eine Zellsuspension der jeweiligen Transformanten wurde verdünnt und die Verdünnungsreihe auf SDC+FOA Platten getropft. Die Zellen wurden 5 Tage bei 30°C inkubiert. Nur Zellen, die ein NES-Test Plasmid mit funktioneller NES-Domäne beinhalten, können auf 5'-FOA-haltigem Medium wachsen.

(B) Parallel dazu sind die Lokalisierungsergebnisse der eGFP-Fusionsproteine unter Normalbedingungen (siehe Material & Methoden 1.5) gezeigt. Konstrukte, die den *Δnmd3*-Phänotyp nicht komplementieren können, zeigen wie erwartet eine starke nukleäre Akkumulation des eGFP-Fusionsproteins.

Der Sequenzabschnitt rpl5(103-117)p kann als Fusion mit NESTPp den letalen *Δnmd3* Phänotyp komplementieren und führt zu einer Wiederherstellung der zytoplasmatischen Lokalisierung des GFP-Fusionsproteins. Die Aminosäuresequenz des eingegrenzten Abschnitts lautet **LLIARRTLQKLGLDE**. Fett gedruckt sind die hydrophoben Leucin oder Isoleucin Reste in diesem Sequenzbereich, da der identifizierte Abschnitt annähernd das für

Leucin-reiche NES-Sequenzen charakteristische Sequenzmotiv $L-X_{2-3}-(F, I, L, V, M)-X_{2-3}-L-X-(I, L)$ besitzt (siehe Einleitung 7.1 und Diskussion). Dies würde auch die Misslokalisierung des Bibliothekkonstrukts NESTP-rpl5(103-197)p und des Volllängenproteins Rpl5p-eGFP im LMB-sensitiven *xpo1*-Hefestamm nach LMB Behandlung erklären. Es scheint sich bei dem Aminosäurebereich rpl5(103-117)p um eine Erkennungssequenz für Xpo1p vermittelten Export zu handeln.

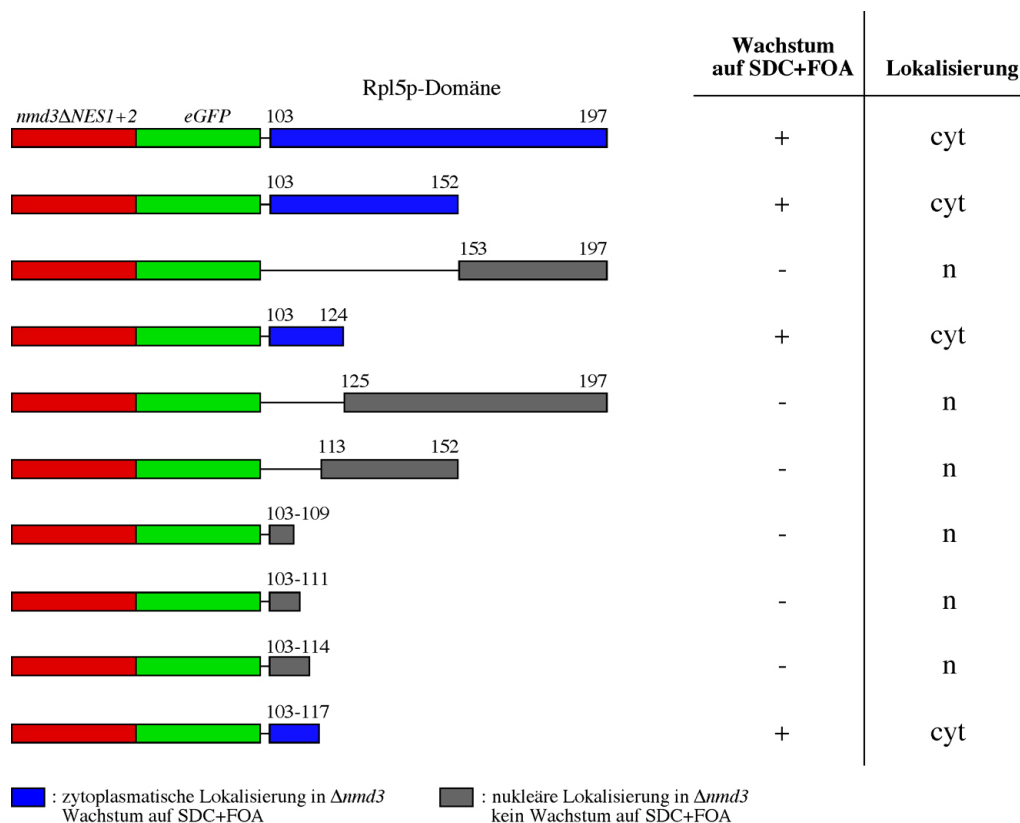


Abb. 19: Schematische Darstellung aller im NES-Test System getesteten Rpl5p-Domänen.

Als kleinstes im System funktionelles Fragment wurde rpl5 AS 103-117 identifiziert. Siehe hierzu auch die Lokalisierungsexperimente und Wachstumsanalyse der Konstrukte in Abbildung 18. Abkürzung bei Lokalisierung der Konstrukte: cyt: zytoplasmatisch; n: nukleär.

2.4.4 *rpl5Δ(101-115)p-eGFP* ist nicht funktionell und akkumuliert im Kern

Um die NES-Funktion des kleinsten funktionellen Fragments rpl5(103-117)p auch im Volllängenprotein nachzuweisen, wurden in diesem Bereich Deletionen und Punktmutationen (siehe 2.4.5) erzeugt, die zu einem Exportdefekt führen sollen. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Deletion der Aminosäurereste 103-108 in Rpl5p zum Zelltod führt (Deshmukh *et al.*, 1995). Dieser Sequenzbereich (LLIARR) ist bei allen 5S rRNA bindenden eukaryontischen Proteinen konserviert und ist auch im kleinsten funktionellen NES-

Fragment von Rpl5p enthalten. Deshmukh und Mitarbeiter diskutieren, dass dieser Abschnitt einen wichtigen Sequenzbereich für die Assoziation mit der 5S rRNA darstellen könnte.

Um die Auswirkungen einer Deletion des gefundenen kleinsten Bereiches auf die Funktionalität und Lokalisierung von Rpl5p zu analysieren, wurde das Plasmid pRS315-*rpl5Δ(101-115)-eGFP* angefertigt (Klonierung siehe Material & Methoden 1.2). Mit diesem Konstrukt wurde einerseits der durch Deshmukh und Mitarbeiter (1995) beschriebene Funktionsverlust überprüft und andererseits getestet, ob der Funktionsverlust eventuell auf einen nukleären Exportdefekt von Rpl5p zurückzuführen sein könnte. Das durch dieses Plasmid kodierte Protein *rpl5Δ(101-115)p-eGFP* kann bei Wachstumsanalysen auf 5'-FOA-haltigem Medium den letalen *Δrpl5* Phänotyp nicht komplementieren (Abb. 20A). Die interne *rpl5p* Deletion führt ausserdem zu einer starken nukleären Akkumulation des GFP-Fusionsproteins (Abb. 20B). Dies bedeutet, dass es die Deletion des Aminosäurebereichs 101-115 zu einem Exportdefekt und zu einem Funktionsverlust des Proteins führt.

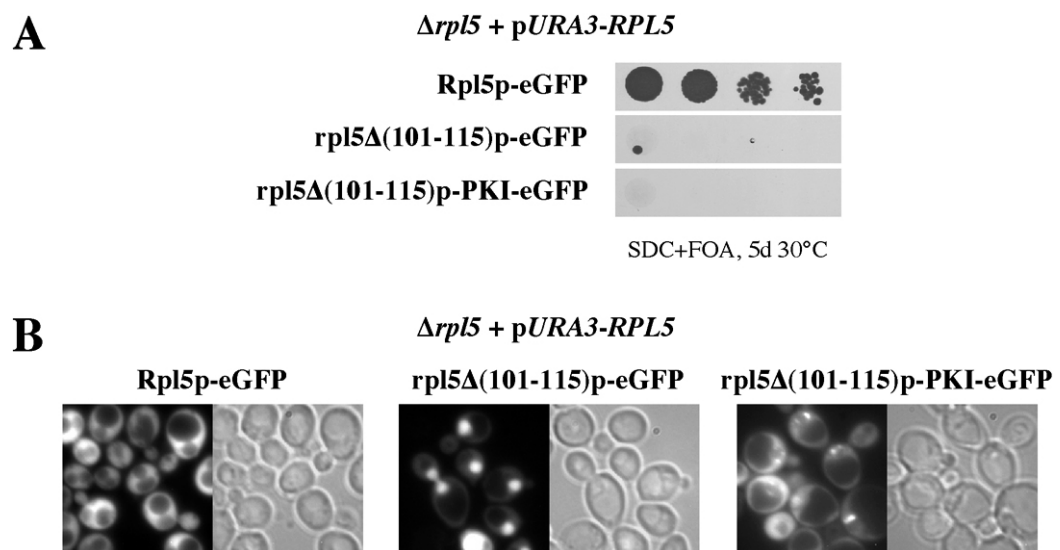


Abb. 20: Eine Deletion der Aminosäuren 101-115 in Rpl5p führt zu einem Funktionsverlust, der nicht durch die PKI-NES komplementiert werden kann.

(A) Die Plasmide pRS315-*RPL5-eGFP*, pRS315-*rpl5Δ(101-115)-eGFP* und pRS315-*rpl5Δ(101-115)-PKI-eGFP* wurden in den "Shuffle" Stamm *Δrpl5 pURA-RPL5* transformiert. Eine Zellsuspension der jeweiligen Transformanten wurde verdünnt und die Verdünnungsreihe auf SDC+FOA Platten getropft. Die Zellen wurden 5 Tage bei 30°C inkubiert. *Rpl5Δ(101-115)p-eGFP* und *rpl5Δ(101-115)p-PKI-eGFP* können den *Δrpl5*-Phänotyp nicht komplementieren.

(B) Parallel dazu sind die Lokalisierungsergebnisse unter Normalbedingungen (siehe Material & Methoden 1.5) gezeigt. Das GFP-Fusionsprotein der Deletion zeigt eine starke nukleäre Akkumulation. Die Fusion mit der heterologen PKI-NES zeigt eine wiederhergestellte zytoplasmatische Lokalisierung, wobei ein gewisser Anteil an nukleolärem Fusionsprotein noch vorhanden ist.

Ein Exportdefekt von Rpl5p, der durch die Deletion der Aminosäuren 101-115 hervorgerufen wird, sollte durch eine Fusion mit einer heterologen NES komplementiert werden können. Deshalb wurde das Deletionsprotein rpl5 Δ (101-115)p-eGFP mit der PKI-NES fusioniert und auf Wiederherstellung der Komplementationsfähigkeit des Δ rpl5 Phänotyps und Lokalisierung des eGFP-Fusionsproteins untersucht. Durch die Fusion mit der PKI-NES kommt es zwar zu einer Wiederherstellung der zytoplasmatischen Lokalisierung des eGFP-Fusionsproteins (mit leichter nukleolärer Anreicherung in einigen Zellen; Abb. 20B), der Funktionsverlust kann jedoch nicht komplementiert werden (Abb. 20A).

Bei dem beobachteten Defekt scheint es sich somit nicht nur um einen Exportdefekt zu handeln, sondern um einen zusätzlichen Funktionsverlust, der möglicherweise durch eine blockierte Assoziation mit der 60S Untereinheit hervorgerufen wird. Es sollte deshalb untersucht werden, ob sich die Deletion der Aminosäurereste 101-115 in Rpl5p auf die Assoziation mit der ribosomalen 60S oder auf die Bindung an 5S rRNA auswirkt. Um diese Frage zu klären, wurden die Zellextrakte von Zellen, die rpl5 Δ (101-115)p-eGFP im Wildtyphintergrund exprimieren, über einen Saccharosedichtegradienten (siehe Material & Methoden 2.2.1) aufgetrennt und die Fraktionen zur Analyse gesammelt. Als Positivkontrolle wurden isogene Wildtypzellen unter gleichen Wachstumsbedingungen benutzt. Die gesammelten Fraktionen beinhalten lösliche Komponenten, die kleine (40S) und große (60S) Untereinheit, sowie Monoribosomen (80S) und Polyribosomen (Polysomen). Die Lokalisierung der Fusionsproteine in den jeweiligen Fraktionen wurde durch Westernblot Analyse bestimmt. Da für Rpl5p kein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, wurde für die Westernblot-Analyse der GFP-Antikörper benutzt. Abbildung 21 zeigt, dass sich Rpl5p-eGFP in der Wildtypsituation wie erwartet in den Fraktionen der 60S Untereinheit und der 80S Fraktion befindet (Abb. 21A). Zusätzlich findet sich ein gewisser Anteil des Proteins in den Fraktionen der Polysomen und im löslichen Bereich, während in der 40S Fraktion kein Rpl5p-eGFP Fusionsprotein vorkommt. Das Deletionsprotein rpl5 Δ (101-115)p-eGFP zeigt dagegen eine unterschiedliche Verteilung (Abb. 21B). Der Hauptteil des Proteins lokalisiert im löslichen Bereich des Gradienten. Da es durch die Deletion zu einer signifikanten Verschiebung des Signals im löslichen Bereich gekommen ist, stellte sich die Frage, ob dies durch eine unterschiedliche Bindung der 5S rRNA hervorgerufen wird.

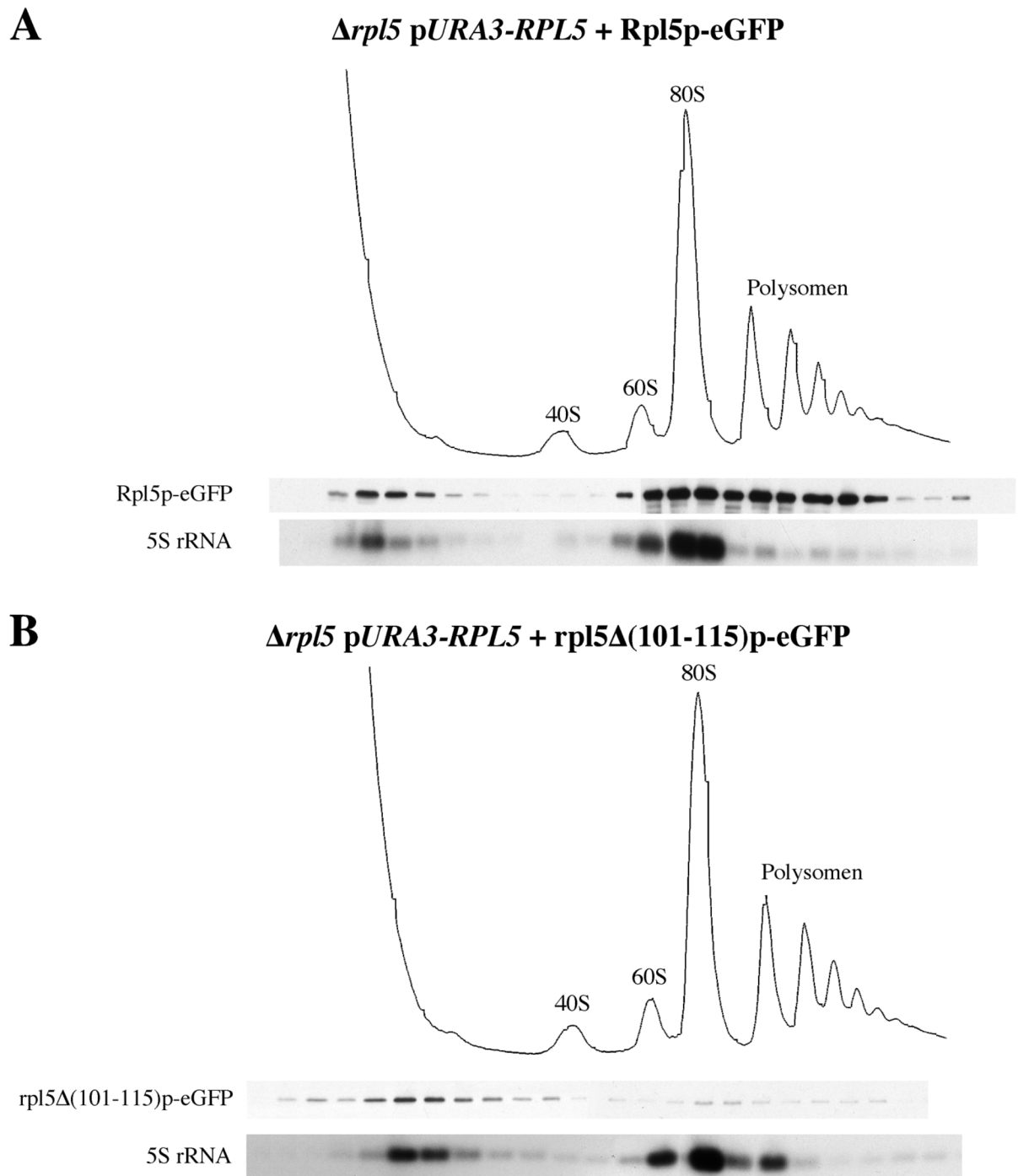


Abb. 21: rpl5Δ(101-115)p-eGFP assoziiert nicht mit der 60S Untereinheit, sondern liegt hauptsächlich ungebunden in den löslichen Fraktionen vor.

Die Rpl5p-eGFP und rpl5Δ(101-115)p-eGFP Fusionsproteine wurden im *Δrpl5 pURA3-RPL5* "Shuffle" Stamm exprimiert. Ein Lysat dieser Zellen wurde über einen 10-50%-igen Saccharosedichtegradienten in der Ultrazentrifuge aufgetrennt (vgl. Material und Methoden 2.2.1). Anschließend wurde das UV-Profil ($\lambda = 254$ nm) des Gradienten bestimmt und dessen Fraktionen gesammelt. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden mit TCA gefällt und über SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Westernblot-Analyse wurde mit einem GFP-Antikörper das Sedimentationsverhalten von Rpl5p-eGFP und rpl5Δ(101-115)p-eGFP bestimmt. Das Deletions-Fusionsprotein lokalisiert nicht mehr in den 60S-, 80S- und Polysomenfraktionen. Zusätzlich wurde aus den gesammelten Fraktionen die RNA isoliert und per Northern Hybridisierungsanalyse die 5S rRNA detektiert. Die 5S rRNA weist keine auffälligen Lokalisierungsunterschiede auf und colokalisiert im löslichen Bereich auch nach Verschiebung des Signals mit rpl5Δ(101-115)p-eGFP.

Aus den gesammelten Fraktionen des Saccharosedichtegradienten wurde deshalb die RNA isoliert und mittels Northernblot Analyse mit einer spezifischen 5S rRNA-Sonde analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die 5S rRNA trotz der deutlichen Verschiebung des Proteinsignals noch mit rpl5 Δ (101-115)p-eGFP im löslichen Bereich colokalisiert. Dies könnte durch eine immer noch vorhandene Bindung zwischen rpl5 Δ (01-115)p-eGFP und der 5S rRNA hervorgerufen werden. Ein großer Anteil der 5S rRNA liegt jedoch durch die Aufreinigung der Proteine und der 5S rRNA im Wildtyphintergrund gebunden an die Rpl5p-Wildtypkopie in den 60S und 80S Fraktionen vor. Der deletierte Aminosäurebereich 101-115 von Rpl5p scheint somit keine 5S rRNA bindende Funktion zu besitzen. Der zusätzliche zum Exportdefekt vorhandene Funktionsverlust des Proteins muss somit durch das Zerstören einer anderen Funktion, wie z.B. der Assoziationsfähigkeit mit der 60S Untereinheit hervorgerufen werden.

2.4.5 Mutationen in der möglichen NES-Sequenz von Rpl5p zeigen Export- und Wachstumsdefekte

Wie gezeigt werden konnte, führt die Deletion des Sequenzbereichs AS 101-115 in Rpl5p nicht nur zu einem starken Exportdefekt, sondern zusätzlich zum Verlust einer weiteren bisher unbekannten Funktion, die nicht über Fusion einer PKI-NES komplementiert werden kann. Da die Deletion rpl5 Δ (101-115)p-eGFP allerdings auch zu einer Missfaltung des Proteins führen könnte, sollten statt einer Deletion Punktmutationen im kleinsten funktionellen Rpl5p NES-Sequenzbereich eingeführt werden. Mutationen haben meist einen weniger drastischen Effekt auf die Proteinfaltung als Deletionen. Durch den gezielten Austausch der hydrophoben Aminosäurereste im Sequenzbereich rpl5(103-117) (LLIARRTLQKLGLDE) sollten mutante Proteine erzeugt werden, die einen Export- und Wachstumsdefekt besitzen. Hierfür wurden folgende Mutationen in *RPL5* auf Plasmidebene erzeugt und anschließend in den Δ rpl5 pURA3-*RPL5* "Shuffle" Stamm transformiert: pRS315-rpl5-LLI103,104,105AAA-eGFP, pRS315-rpl5-LL103,104DD-eGFP, pRS315-rpl5-RR107,108AA-eGFP, pRS315-rpl5-TL109,110AA-eGFP, pRS315-rpl5-L110D-eGFP und pRS315-rpl5-LL113,115DD-eGFP (siehe Material & Methoden 1.2). In Abbildung 22 sind exemplarisch die Ergebnisse der Wachstumsanalyse auf 5'-FOA-haltigem Medium und der Lokalisierungsexperimente der oben unterstrichenen mutierten Konstrukte gezeigt. Mutationen in den ersten sechs Aminosäureresten (LLIARR) des Sequenzbereiches führen zu einer starken nukleären Akkumulation des GFP-Fusionsproteins und zu einem kompletten Verlust der Komplementationsfähigkeit des Δ rpl5 Phänotyps (bestätigt durch Mutationen

rpl5-LL103,104DDp-eGFP und rpl5-RR107,108AAp-eGFP; Daten nicht gezeigt). Durch die bereits beschriebene Konservierung dieser Sequenz in allen 5S rRNA bindenden Proteinen, scheint auch durch die Mutationen, ähnlich der Deletion der Aminosäurereste 101-115, eine essentielle Funktion getroffen zu sein, die entweder den Export von Rpl5p oder die Ribosomenbiogenese zusammenbrechen lässt. Es scheint sich allerdings nicht um eine Bindungsstelle für 5S rRNA zu handeln, da die 5S rRNA noch mit dem deletierten Protein rpl5Δ(101-115)p-eGFP colokalisiert (siehe Abb. 22).

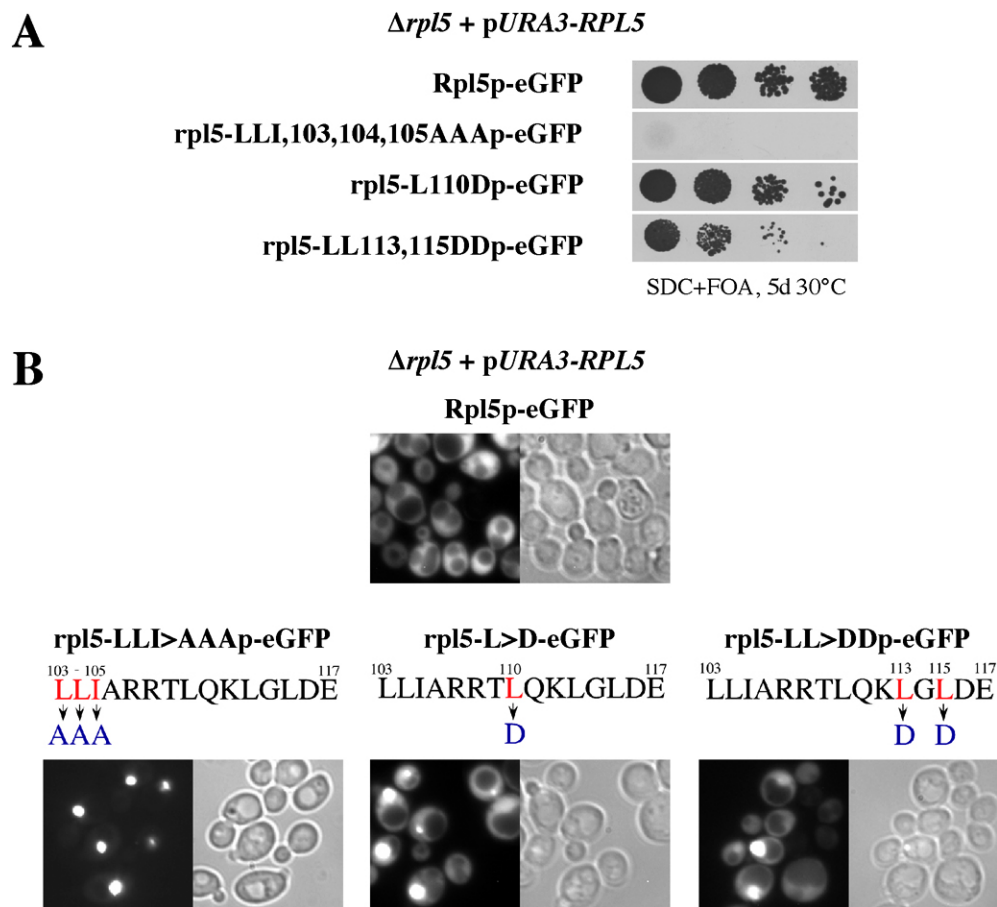


Abb. 22: Punktmutationen in Rpl5p-eGFP zeigen Wachstumsdefekte und nukleäre Akkumulation.

Die Plasmide pRS315-*RPL5-eGFP*, pRS315-*rpl5-L110D-eGFP*, pRS315-*rpl5-LL113,115DD-eGFP* und pRS315-*rpl5-LLI103,104,105AAA-eGFP* wurden in den "Shuffle" Stamm $\Delta rpl5$ p*URA3-RPL5* transformiert.

(A) Eine Zellsuspension der jeweiligen Transformanten wurde verdünnt und die Verdünnungsreihe auf SDC+FOA Platten getropft. Die Zellen wurden 5 Tage bei 30°C inkubiert. Die Mutation rpl5-LLI>AAA kann den $\Delta rpl5$ -Phänotyp nicht komplementieren. Die Mutation rpl5-LL>DD zeigt einen schwachen Wachstumsdefekt auf SDC+FOA bei 30°C, während die Mutation rpl5-L>D bei 30°C nicht beeinträchtigt zu sein scheint.

(B) Gezeigt ist die Sequenz der kleinsten im NES-Komplementations System funktionellen Rpl5p-Domäne und die darin erzeugten Mutationen. Parallel dazu sind die Lokalisierungsergebnisse der eGFP-Fusionsproteine unter Normalbedingungen (siehe Material & Methoden 1.5) gezeigt. Alle erzeugten mutanten Proteine akkumulieren mehr oder weniger stark im Kern.

Die Mutationen der hydrophoben Leucin-Reste im mittleren Teil des Sequenzbereiches zeigen ebenfalls eine nukleäre Misslokalisierung des GFP-Fusionsproteins. Allerdings befindet sich im Gegensatz zu den Mutationen im vorderen Sequenzbereich noch ein Anteil der Proteine *rpl5-L110Dp-eGFP* und *rpl5-LL113,115DDp-eGFP* im Zytoplasma (Abb. 22B). Während durch die *rpl5-L110D* Mutation keine Veränderung in der Komplementationsfähigkeit des $\Delta rpl5$ Phänotyps auftritt, kommt es durch den Austausch der Leucin-Reste 113,115 gegen Asparat zu einem Wachstumsdefekt bei 37°C (Abb. 22A).

Um zu untersuchen, ob die Mutationen *rpl5-L110D* und *rpl5-LL113,115DD* zu temperatur-sensitiven Allelen geführt haben, wurde das Wachstum der Transformanten auf SDC+FOA bei 30°C und 37°C analysiert (Abb. 23A). Zusätzlich zur Wachstumsanalyse auf 5'-FOA-haltigem Medium wurden Lokalisierungsexperimente der eGFP-Fusionsproteine in den transformierten Zellen nach Inkubation bei 30°C und 37°C durchgeführt (Abb. 23B).

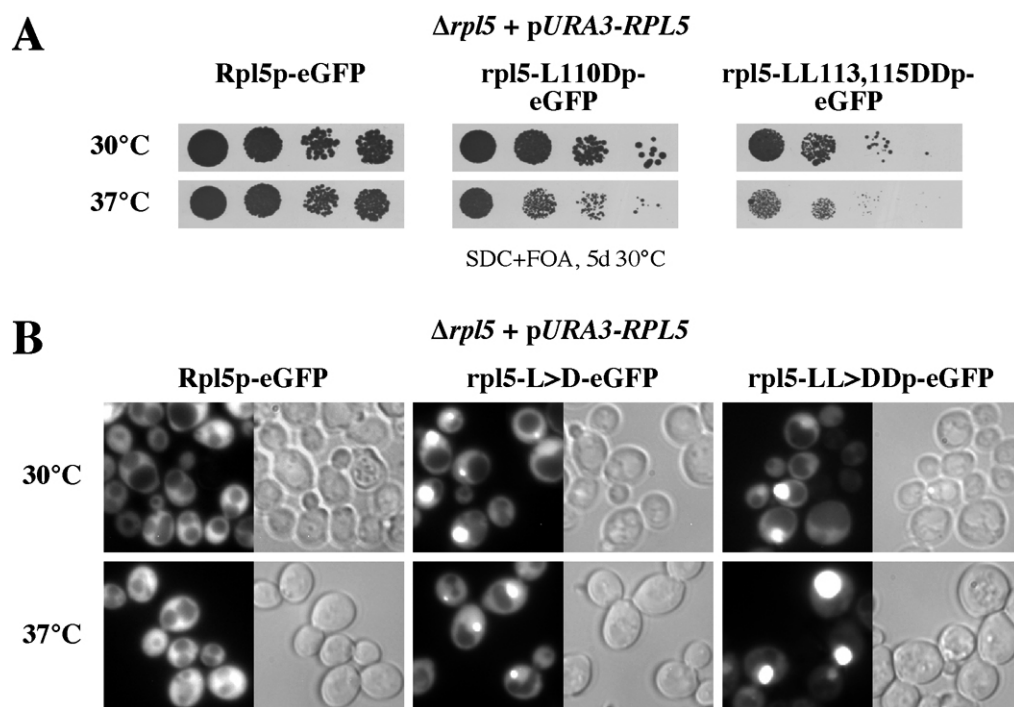


Abb. 23: Die Mutationen *rpl5-L110Dp* und *rpl5-LL113,115DDp* zeigen einen Wachstumsdefekt bei 37°C.

(A) Die Plasmide *pRS315-RPL5-eGFP*, *pRS315-rpl5-L110D-eGFP* und *pRS315-rpl5-LL113,115DD-eGFP* wurden in den "Shuffle" Stamm $\Delta rpl5$ *pURA-RPL5* transformiert. 1:10 Verdünnungen wurden auf SDC+FOA Platten getropft. Die Zellen wurden 5 Tage bei 30°C bzw. 5 Tage bei 37°C inkubiert, um das Wachstum zu testen. Beide Mutationen zeigen bei 37°C einen starken bzw. verstärkten Wachstumsdefekt im Vergleich mit dem Wildtyp.

(B) Die Lokalisierung der eGFP-Fusionsproteine wurde bei 30°C und nach 3 stündiger Inkubation bei 37°C analysiert. Beide Mutationen zeigen im Gegensatz zur Wildtypsituation bei 30°C und 37°C nukleäre Akkumulation des eGFP-Proteins.

Beide Mutationen zeigen bei einer Temperatur von 37°C einen verstärkten Wachstumsdefekt und eine nukleäre Misslokalisierung des jeweiligen Fusionsproteins. Die nukleäre Akkumulation der mutanten Fusionsproteine kann jedoch bereits bei 30°C beobachtet werden, wogegen sich die zytoplasmatische Lokalisierung des Wildtyp Fusionsproteins Rpl5p-eGFP nach Inkubation der transformierten Zellen bei 37°C nicht ändert.

Es stellte sich weiterhin die Frage, ob die Mutationen L110D und LL113,115DD auch zu einem Verlust der NES-Funktion der im NES-Assay gefundenen Rpl5p-Domäne führen. Um dies beantworten zu können, wurden die mutierten Domänen rpl5(103-197)-L110D und rpl5(103-197)-LL113,115DD im NES-Test System auf Komplementationsfähigkeit des *Δnmd3* Phänotyps und auf die zelluläre Lokalisierung der Fusionsproteine untersucht.

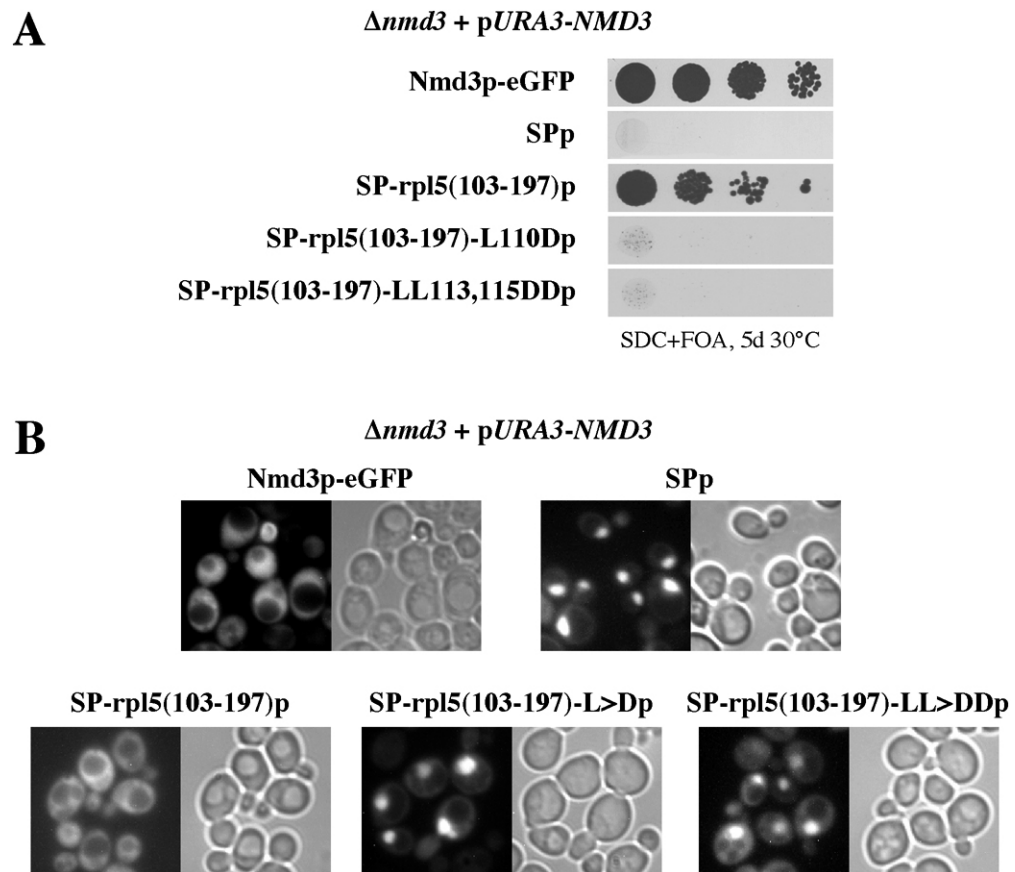


Abb. 24: Mutationen in der Rpl5p-Domäne AS 103-197 inaktivieren die NES-Funktion im NES-Assay. Der *Δnmd3* p*URA3-NMD3* "Shuffle" Stamm wurde mit den Plasmiden pRS315-*NMD3-eGFP*, NESTP, NESTP-*rpl5-103-197*, NESTP-*rpl5(103-197)-L110D* und NESTP-*rpl5(103-197)-LL113,115DD* transformiert. (A) Das Wachstum der Transformanten wurde auf SDC+FOA nach 5 Tagen Inkubation bei 30°C analysiert. Die Fusionen der mutierten Sequenzbereiche können, im Gegensatz zum gefundenen NES-Kandidaten, den *Δnmd3* Phänotyp nicht komplementieren. (B) Zusätzlich wurde die zelluläre Lokalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Normalbedingungen (siehe Material & Methoden 1.5) analysiert. Die mutierten Domänen im NES-Konstrukt akkumulieren im Kern.

Hierfür wurden die Plasmide *pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(103-197)-L110D* (NESTP-*rpl5(103-197)-L110D*) und *pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(103-197)-LL113,115DD* (NESTP-*rpl5(103-197)-LL113,115DD*) generiert (siehe Material und Methoden 1.2) und in den “Shuffle” Stamm *Δ nmd3 pURA3-NMD3* transformiert. Als Kontrollen wurden *pRS315-NMD3-eGFP*, *pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-LCS* (NESTP) und das im NES-Assay gefundene Bibliothekskonstrukt *NESTP-rpl5(103-197)* benutzt.

Durch Wachstumsanalyse der Transformanten auf 5'-FOA-haltigem Medium und Lokalisierungsstudien der GFP-Fusionsproteine konnte gezeigt werden, dass die mutierten *rpl5*-Domänen im NES-Assay nicht funktionell sind (Abb. 24A) und die entsprechenden Fusionsproteine stark im Kern akkumulieren (Abb. 24B). Damit konnte gezeigt werden, dass die Sequenzdomäne *rpl5(103-197)* durch Mutationen der Leucin-Reste ihre Exportkompetenz verliert.

Eine weitere Fragestellung war, ob durch die Mutationen *rpl5-L110D* und *rpl5-LL113,115DD* auch die Ribosomenbiogenese beeinflusst wird. Die von Deshmukh und Mitarbeitern (1995) beschriebenen *rpl5-ts* Mutationen, die einen 60S Exportdefekt aufweisen (siehe Abb. 16) liegen nicht in dem durch den NES-Assay identifizierten Bereich *rpl5(103-197)*. Deshalb wurde der Einfluss der in dieser Arbeit generierten Mutationen *rpl5-L110D* und *rpl5-LL113,115DD* auf den Export der ribosomalen 60S Untereinheit und der Ribosomenbiogenese untersucht. In einem mit *rpl5-L113,115DD* komplementierten *Δ rpl5* Stamm wurde die Lokalisierung des 60S-Reporterproteins Rpl25p-eGFP bei permissiver und restriktiver Temperatur untersucht. Der temperatursensitive *rpl5* Stamm zeigte wie erwartet einen starken Wachstumsdefekt bei 37°C (Daten nicht gezeigt). Da allerdings das Wachstum der Zellen durch die Mutation auch bei 30°C verlangsamt ist, wurde die Lokalisierung des Reporterproteins Rpl25p-eGFP bei 23°C und 37°C untersucht. Es kann eine starke nukleäre Akkumulation des Rpl25p-eGFP Reporterproteins bei 37°C beobachtet werden (Abb. 25A). Allerdings kommt es auch bei 23°C in manchen Zellen zu einer Anreicherung des Fusionsproteins. Dies zeigt, dass der Export der ribosomalen 60S Untereinheit in der temperatursensitiven *rpl5-LL113,115DD* bei restriktiver und teilweise sogar bei permissiver Temperatur gehemmt ist. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden Zelllysate der *rpl5-ts*-Mutante und des isogenen *RPL5*-Wildtyps mittels Saccharosedichtegradienten bei permissiver und restriktiver Temperatur analysiert (Abb. 25B & C). Die bei 23°C gezogene *rpl5-ts*-Mutante und der *RPL5*-Wildtyp bei 23°C und 37°C zeigen ein normales Wildtypprofil. Der Saccharosedichtegradient der Mutante zeigt bei 37°C allerdings deutliche Defekte (Abb. 25B). Es kommt zu einer leichten Verschiebung des Verhältnisses von 40S zu

60S und es können sogenannte “half-mer”-Polysomen beobachtet werden. Diese sind Polysomen, die nur eine 40S Untereinheit gebunden an die Translationsinitiationsstelle der mRNA besitzen. Durch die durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass die Mutation LL113,115DD in Rpl5p zu einer Blockade des Exports der 60S Untereinheit und damit zu einem Defekt der Ribosomenbiogenese führt.

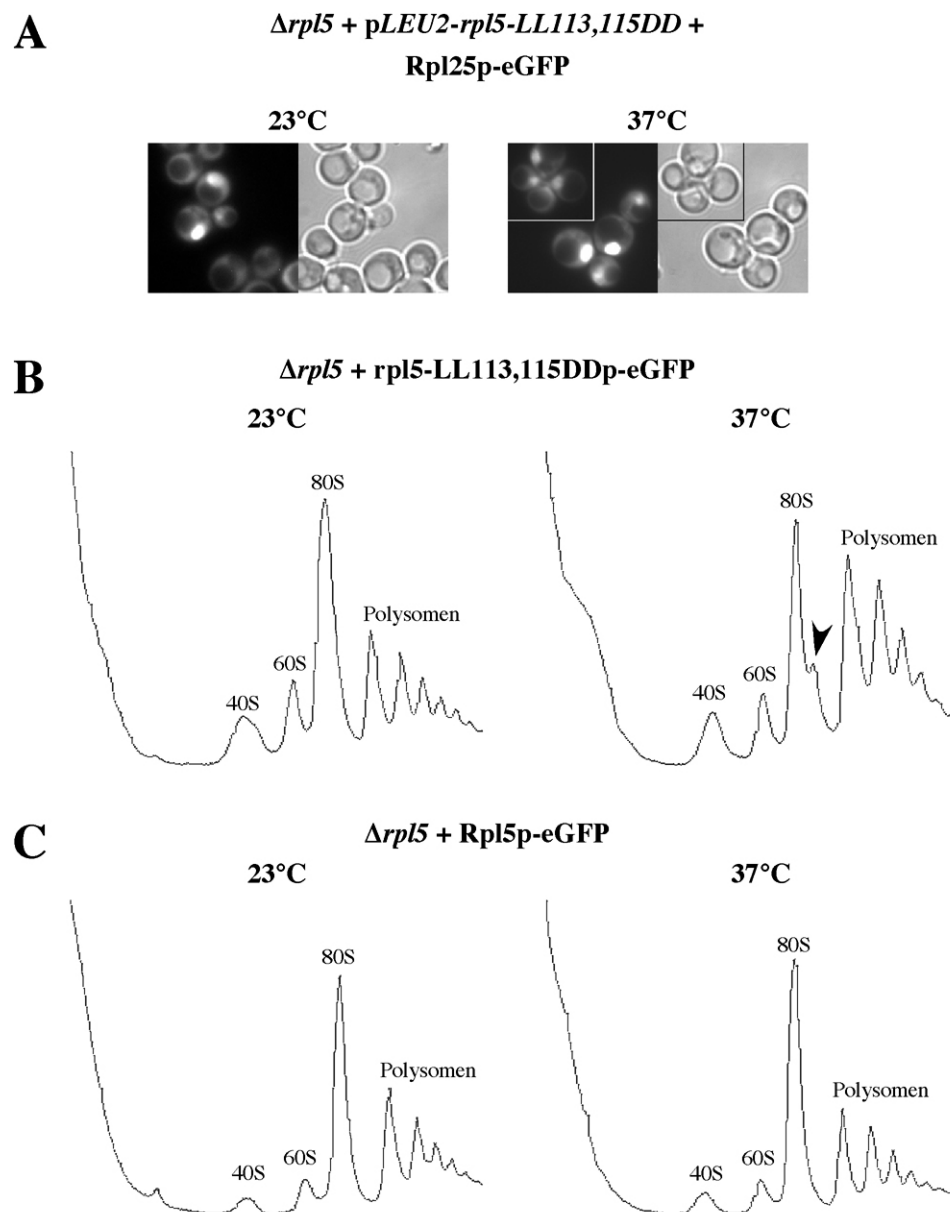


Abb. 25: Die Mutation *rpl5-LL113,115DD* zeigt einen 60S Exportdefekt bei 37°C.

(A) Das Plasmid pRS313-*RPL25-eGFP* wurde in den Stamm $\Delta rpl5$ *pLEU-rpl5-LL113,115DD* transformiert. Die Lokalisierung des Rpl25p-eGFP-Reporterproteins wurde wie von Gadai und Mitarbeitern (2001a) beschrieben bei 23°C und 37°C analysiert. Es kommt zu einer starken nukleären Akkumulation des Reporterproteins bei 37°C. Selbst bei 23°C zeigen manche Zellen eine Anhäufung von Rpl25p-eGFP im Kern.

(B) Hefekulturen von $\Delta rpl5 + rpl5-LL113,115DDp-eGFP$ und $\Delta rpl5 + Rpl5p-eGFP$ wurden bei 23°C gezogen bzw. zusätzlich 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden auf 10 – 50%ige Saccharosedichtegradienten aufgetragen, zentrifugiert und das UV-Profil ($\lambda = 254\text{nm}$) aufgenommen. Sogenannte „half-mer“-Polysomen sind mit Pfeilspitzen gekennzeichnet.

2.4.6 Der Wachstumsdefekt der *rpl5p*-Punktmutanten wird nicht durch eine heterologe NES komplementiert

Ein durch einen blockierten Export des punktmutierten Proteins Rpl5p hervorgerufener Defekt der Ribosomenbiogenese sollte durch Fusion eines heterologen Exportsignals komplementiert werden können. Um dies zu testen, wurden Fusionen der punktmutierten *rpl5p*-Konstrukte mit der heterologen PKI-NES angefertigt (siehe Material & Methoden 1.2) und anschließend in den “Shuffle” Stamm $\Delta rpl5$ *pURA3-RPL5* transformiert. Das Wachstum der transformierten Zellen wurde auf 5'-FOA-haltigem Medium getestet und die zelluläre Verteilung der Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Abb. 26).

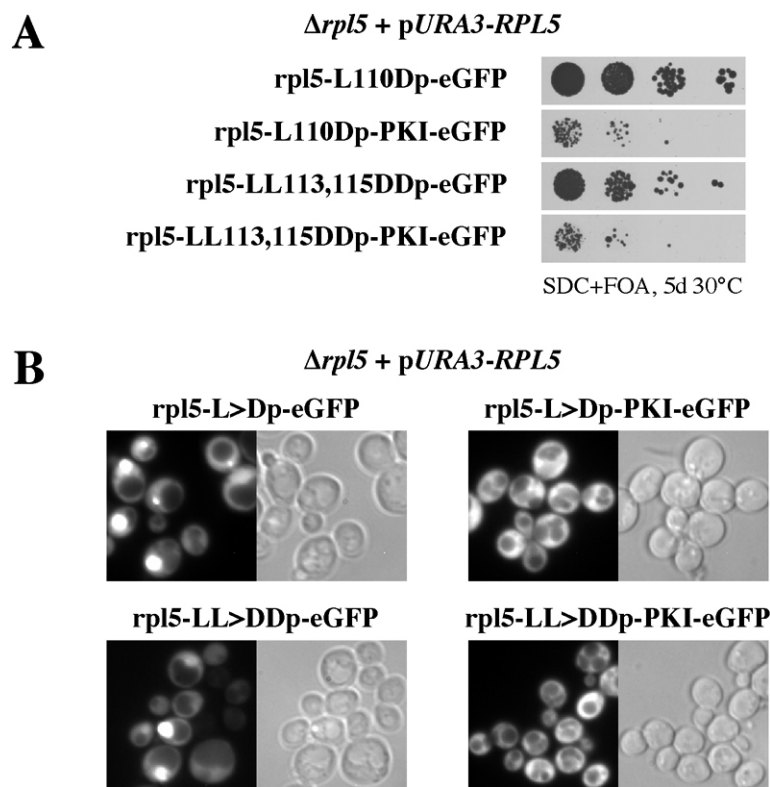


Abb. 26: Die Fusion der heterologen PKI-NES an die Mutationen *rpl5-L110Dp-eGFP* und *rpl5-LL113,115DDp-eGFP* verstärken den Wachstumsdefekt.

Die Plasmide *pRS315-RPL5-eGFP*, *pRS315-rpl5-L110D-eGFP*, *pRS315-rpl5-L110D-PKI-eGFP*, *pRS315-rpl5-LL113,115DD-eGFP* und *pRS315-rpl5-LL113,115DD-PKI-eGFP* wurden in den “Shuffle” Stamm $\Delta rpl5$ *pURA3-RPL5* transformiert.

(A) Eine Zellsuspension der jeweiligen Transformanten wurde verdünnt und die Verdünnungsreihe auf SDC+FOA Platten getropft. Die Zellen wurden 5 Tage bei 30°C inkubiert.

(B) Parallel dazu sind die Lokalisierungsergebnisse der eGFP-Fusionsproteine gezeigt. Durch Fusion der PKI-NES an die mutierten *rpl5p*-Proteine wird die zytoplasmatische Lokalisierung der Fusionsproteine wiederhergestellt.

Unerwarteterweise stellte sich bei der Wachstumsanalyse der Transformanten heraus, dass der Wachstumsdefekt der *rpl5*-Punktmutanten durch die Fusion mit der PKI-NES noch verstärkt wurde. So zeigt selbst die bei 30°C kaum im Wachstum beeinträchtigte *rpl5-L110D* Mutante in Fusion mit der PKI-NES einen deutlichen Wachstumsdefekt (Abb. 26A). Dieses Ergebnis ist überraschend, da die beeinträchtigte Funktion reiner Exportmutanten normalerweise durch Fusionen mit heterologen NES-Sequenzen wiederhergestellt werden kann. Ein Beispiel hierfür ist, wie schon gezeigt, Nmd3p (siehe Ergebnisse 1.1).

Um sicher zu stellen, dass der auftretende Wachstumsdefekt durch die Fusion der heterologen NES hervorgerufen wird, wurde eine analog konstruierte Fusion der *RPL5*-Mutationen mit der Rev-NES hergestellt. Auch durch diese heterologe NES wird der Wachstumsdefekt beider Punktmutationen verstärkt (Daten nicht gezeigt). Die Lokalisierungsexperimente der Fusionsproteine mit der PKI-NES ergaben hingegen, dass der Export vollkommen wiederhergestellt werden konnte (Abb. 26B).

Um zu klären, ob der verstärkte Wachstumsdefekt durch eine nicht intakte Ribosomenbiogenese erklärbar ist, wurden Lysate von Zellen hergestellt, die vorher mit *pRS315-rpl5-L110D-eGFP* oder *pRS315-rpl5-L110D-PKI-eGFP* transformiert wurden. Es wurde das *rpl5-L110D*-mutierte Konstrukt für diese Experimente gewählt, da es bei 30°C keine Beeinträchtigung der Komplementation des $\Delta rpl5$ Phänotyps auf 5'-FOA-haltigem Medium aufweist. Da die Zellen bei 30°C normales Wachstum zeigen, sollte die Ribosomenbiogenese ebenfalls nicht stark beeinflusst sein. Ausserdem ist der auftretende Wachstumsunterschied zwischen *rpl5-L110Dp-eGFP* und *rpl5-L110Dp-PKI-eGFP* am größten. Die Lysate wurden über einen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt und analysiert (Abb. 27B & D). Zeigt sich bei *rpl5-L110Dp-eGFP* ein normales Wildtypprofil, kommt es durch die Fusion der PKI-NES an das mutierte *rpl5-L110D-eGFP* zur Bildung von sogenannten "half-mer"-Polysomen. Auch das Verhältnis von 40S zu 60S scheint verschoben zu sein, denn es liegt im Vergleich weniger 60S in $\Delta rpl5$ + *rpl5-L110D-PKI-eGFP* vor. Obwohl das Fusionsprotein mit der PKI-NES eine vollständig wiederhergestellte zytoplasmatische Lokalisierung besitzt, kommt es trotzdem zu einem Ribosomenbiogenesedefekt, der wahrscheinlich hauptsächlich für den Wachstumsdefekt verantwortlich ist. Dies könnte durch eine weitere Funktion der mutierten Domäne, die nicht durch die PKI-NES komplementiert werden kann, oder durch eine Regulierung der NES-Aktivität in Rpl5p, die durch eine "unregulierbare" NES nicht wiederhergestellt werden kann, zustande gekommen sein (siehe hierzu auch Diskussion).

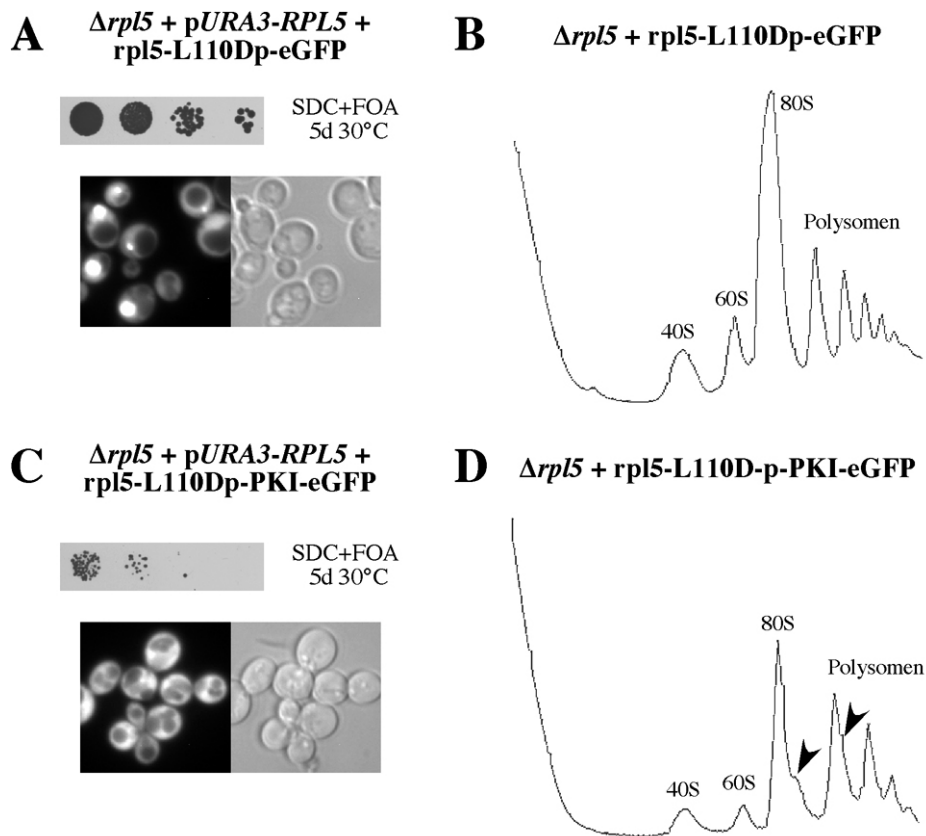


Abb. 27: Eine Fusion der PKI-NES an rpl5-L110Dp-eGFP zeigt einen Defekt in der Ribosomenbiogenese.

(A)&(C) Durch die heterologe PKI-NES wird zwar der defekte Export des mutierten Fusionsproteins wiederhergestellt, der Wachstumsdefekt im $\Delta rpl5$ pURA3-RPL5 “Shuffle” Stamm auf SDC+FOA wird aber verstärkt.

(B)&(D) Hefekulturen von $\Delta rpl5$ + rpl5-L110Dp-eGFP und $\Delta rpl5$ + rpl5-L110Dp-PKI-eGFP wurden bei 30°C inkubiert und anschließend lysiert. Diese Lysate wurden auf 10 – 50%ige Saccharosedichtegradienten aufgetragen, zentrifugiert und das UV-Profil ($\lambda = 254\text{nm}$) aufgenommen. Durch die Fusion der PKI-NES mit dem mutierten rpl5p-Protein kommt es zu einem Defekt in der Ribosomenbiogenese. Sogenannte „half-mer“-Polysomen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Daher stellte sich die Frage, ob eine Fusion der PKI-NES mit dem Volllängenprotein Rpl5p ebenfalls einen Wachstumsdefekt hervorrufen würde. Um dies zu klären wurde das Plasmid pRS315-RPL5-PKI-eGFP analog zu den mutierten Konstrukten generiert (siehe Material & Methoden 1.2) und in den “Shuffle” Stamm $\Delta rpl5$ pURA3-RPL5 transformiert. Nach negativer Selektion gegen das URA3-RPL5-Wildtypplasmid durch Inkubation der Transformanten auf 5'-FOA-haltigem Medium, wurden Wachstumsanalysen auf YPD Medium bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt (Abb. 28). Als Kontrollen dienten die mit pRS315-RPL5-eGFP und den jeweiligen Mutationsplasmiden pRS315-rpl5-L110D-eGFP und pRS315-rpl5-LL113,115DD-eGFP (mit und ohne PKI-NES) transformierten Hefezellen.

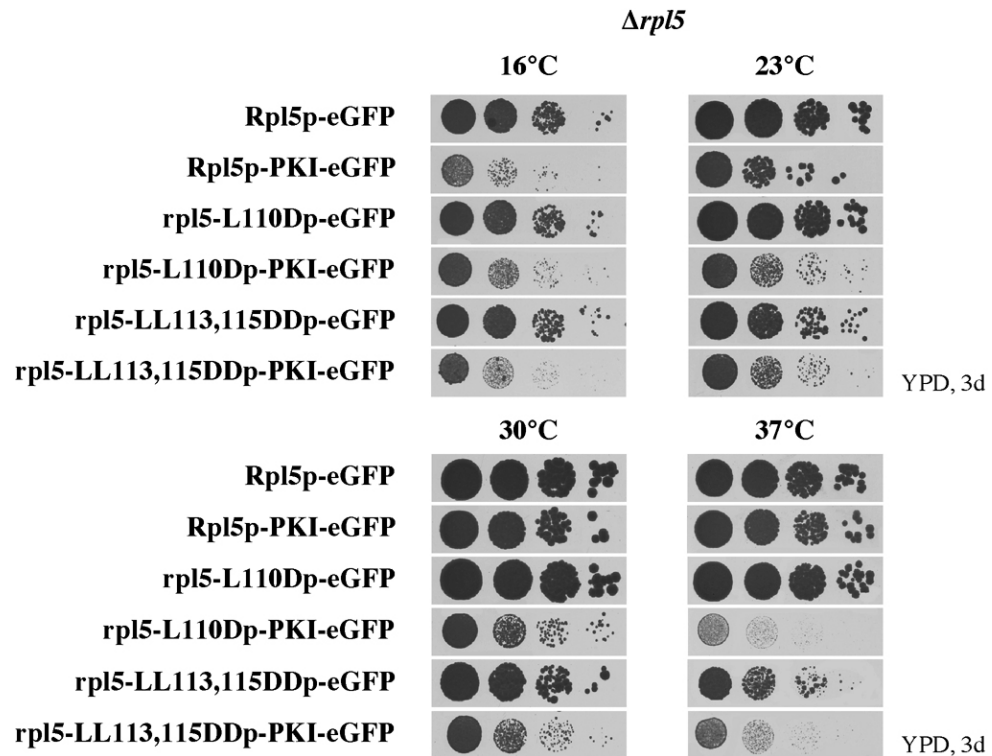


Abb. 28: Fusion der heterologen PKI-NES an Rpl5p-eGFP führt zu einem Wachstumsdefekt bei niedrigen Temperaturen.

Die Plasmide pRS315-*RPL5-eGFP*, pRS315-*RPL5-PKI-eGFP*, pRS315-*rpl5-L110D-eGFP*, pRS315-*rpl5-L110D-PKI-eGFP*, pRS315-*rpl5-LL113,115DD-eGFP* und pRS315-*rpl5-LL113,115DD-PKI-eGFP* wurden in den "Shuffle" Stamm *Δrpl5* p*URA3-RPL5* transformiert. Die *URA3*-Wildtypkopie wurde durch Inkubation auf SDC+FOA aus der Zelle entfernt und anschließend das Wachstum auf YPD-Platten bei den angegebenen Temperaturen analysiert. Dabei zeigt Rpl5p-PKI-eGFP einen Wachstumsdefekt bei niedrigen Temperaturen.

Während die Mutationen einen temperatursensitiven Wachstumsdefekt bei hohen Temperaturen zeigen, der durch die Fusion mit der PKI-NES jeweils verstärkt wird, kommt es dagegen bei Wildtyp RPL5p-PKI-eGFP zu einem Wachstumsdefekt bei niedrigen Temperaturen (16°C und 23°C). Dieser Phänotyp wird als kältesensitiv bezeichnet. Es zeigt sich durch diese Experimente, dass durch eine Fusion mit der PKI-NES an *RPL5* ebenfalls ein Wachstumsdefekt hervorgerufen werden kann, wenn auch nur bei niedrigen Temperaturen. Eine mögliche Erklärung für diese beobachteten Effekte wäre ein durch die PKI-NES hervorgerufener unkontrollierter Export von Rpl5p, bevor das Protein seine eigentliche nukleäre Funktion erfüllen kann (siehe hierzu auch Diskussion).

DISKUSSION & AUSBLICK

Der Austausch von Molekülen zwischen Zellkern und Zytoplasma wird von der Zelle zur Steuerung zellulärer Prozesse genutzt. Ein Beispiel für diese Art von Regulation ist der nukleäre Export von Proteinen, die eine Rolle bei der Biogenese von RNA/Protein Partikeln spielen. Durch den regulierten Export solcher Proteine ist die Zelle in der Lage, als Antwort auf extrazelluläre Veränderungen die Transkription und Translation nachhaltig zu beeinflussen.

Eine Aufklärung solcher regulativen Transportvorgänge erfordert die Identifizierung von entsprechenden physiologischen Exportsubstraten und deren Exportwegen. In der Hefe *S. cerevisiae* sind bisher nur Verfahren zur Untersuchung des Exports beschrieben worden, die dazu beitragen können, potentielle Substrate eines bestimmten Exportweges zu testen oder neue, für den Export eines bestimmten Substrates notwendige Faktoren zu identifizieren (siehe Einleitung 8.). Bisher wurde allerdings keine Methode beschrieben, die eine Identifizierung von NES-Sequenzen über deren Funktion nukleärem Export zu vermitteln ermöglicht.

1. Ein funktioneller NES-Test um neue NES-Sequenzen zu finden

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue *in vivo* Methode entwickelt, um direkt nach Exportsignalsequenzen in Proteinen über ihre Exportfunktion zu suchen. Als Basis dient das essentielle Hefeprotein Nmd3p (siehe Ergebnisse 1.), welches in den Zellkern misslokalisiert, wenn beide C-terminalen NES-Sequenzen zerstört werden. Diese Misslokalisierung führt zu einem Verlust der Lebensfähigkeit der Zellen. Durch Fusion einer heterologen NES an dieses exportdefiziente *nmd3ΔNES1+2*-Konstrukt, sind die Zellen lebensfähig und zeigen eine zytoplasmatische Lokalisierung des Fusionsproteins (Gadal *et al.*, 2001a; Ho *et al.*, 2000). Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde ein System zur Durchmusterung des gesamten Hefegenoms nach neuen Exportsignalen aufgebaut und dessen Funktion anhand verschiedener Kontrollen bestätigt. Eine putative NES-Sequenz in einem genomischen Fragment kann in diesem NES-Test System sowohl durch das Kriterium des wiederhergestellten Zellwachstums, als auch durch zytoplasmatische Lokalisierung des Fusionsproteins mittels Fluoreszenzmikroskopie identifiziert werden.

Das für diese Arbeit konstruierte System kann auch zur Bestätigung einer vermuteten NES-Aktivität von Protein-Domänen eingesetzt werden. So konnte mit Hilfe des Systems für einige Proteine gezeigt werden, dass sie NES-Domänen oder Export-unterstützende Fragmente enthalten. Es wurden Proteine ausgewählt, die entweder ein nicht klassisches Leucin-reiches Exportsignal tragen, aber über Xpo1p exportiert werden, oder solche, die an einem Ran-unabhängigen Transportweg beteiligt sind. Beispielsweise wurden die Ran-unabhängigen mRNA-Exportfaktoren Mex67p und Mtr2p getestet. Der C-terminale Bereich von Mex67p zeigt hierbei eine Komplementation des *Δnmd3*-Phänotyps sowie eine wiederhergestellte zytoplasmatische Lokalisierung des Fusionsproteins. Ob die Komplementationsfähigkeit durch einen bereits beschriebenen Rev-NES ähnlichen Sequenzbereich im C-Terminus von Mex67p (Segref *et al.*, 1997) oder eher durch einen indirekt vermittelten Export durch Bindungsaffinität des C-Terminus an die Kernpore oder an den zu exportierenden mRNP zustande kommt, bleibt ungeklärt. Interessanterweise besitzt Mtr2p, das zusammen mit Mex67p am mRNA Export beteiligt ist, keine Komplementationsfähigkeit.

Es ist bekannt, dass für den Export von Yrb1p die gesamte Ran-Bindungsdomäne notwendig ist (Künzler *et al.*, 2000). Diese besitzt keine Homologie zu bekannten NES Konsensus-Sequenzen, wie z.B. der klassischen Leucin-reichen NES, wird aber trotzdem über einen Xpo1p und Ran abhängigen Transportweg exportiert. Im NES-Test System wurde sowohl das Yrb1p Gesamtprotein als auch die isolierte Ran-Bindungsdomäne (RBD) von Yrb1p getestet. Es kam in beiden Fällen zu einer sehr schwachen Komplementation des *Δnmd3* Phänotyps und die Lokalisierung des Fusionsproteins blieb überwiegend nukleär (Daten nicht gezeigt). Da die Ran-Bindungsdomäne von Yrb1p sowohl NLS- als auch NES-Aktivität besitzt (Künzler *et al.*, 2000), könnte die NLS von Yrb1p zusammen mit der NLS von Nmd3p das Fusionsprotein im Kern halten und somit eine Wiederherstellung der zytoplasmatischen Lokalisierung und der vollständigen Komplementation verhindern.

Wurden mit Yrb1p und den mRNA Exportfaktoren Mex67p und Mtr2p Proteine mit bekannter Exportdomäne oder einer beschriebenen Beteiligung am Exportweg eines Substrates getestet, kann die entwickelte Methode auch zur Charakterisierung einer möglichen NES-Funktion innerhalb einer Proteindomäne benutzt werden. So konnte dem "coiled coil" Bereich von Ulp1p, dem SUMO1-dekonjugierenden Enzym in *S. cerevisiae*, mit dem funktionellen NES-Assay eine NES-Aktivität zugewiesen werden (Panse *et al.*, 2002). Ulp1p liegt durch eine Ran-unabhängige Interaktion mit dem Importin α/β Heterodimer an der Kernpore verankert vor. Eine NES in Ulp1p könnte dafür verantwortlich

sein, dass Ulp1p auch nach etwaigem Import sofort wieder exportiert wird, da nukleäres Ulp1p toxisch für die Zelle ist. Panse und Mitarbeiter (2002) diskutieren, dass die Lokalisierung von Ulp1p in der Nähe des Transportkanals für eine effiziente SUMO-1 Dekonjugation von sumoylierten Transportsubstraten bei der Translokation durch den Kernporenkanal verantwortlich sein könnte.

Auch für das in einem 2-Hybrid-“Screen” gefundene neuartige Gsp1p-bindende Protein Yrb30p, konnte mit Hilfe des funktionellen NES-Assays ein Exportsignal im C-Terminus des Proteins nachgewiesen werden (Braunwarth *et al.*, 2002). Yrb30p wird als ein möglicher Pilz-spezifischer Modulator des RanGTPase-Zyklus diskutiert, der zwischen Zytoplasma und Zellkern hin- und herwandert. Die identifizierten Sequenzbereiche mit einer NES-Funktion aus Ulp1p und Yrb30p zeigen ein für eine Leucin-reiche NES typisches Muster an hydrophoben Resten. Dies deutet in beiden Fällen auf einen Export über das Exportin Xpo1p hin, was bisher allerdings in den Vollängenproteinen nicht bestätigt werden konnte.

2. Ergebnisse des funktionellen NES-Assays

2.1 Kategorisierung der gefundenen Kandidaten

Durch die Herstellung der NES-Bibliotheken wurde die Grundlage geschaffen, durch genomische DNA-Fragmente kodierte Peptidsequenzen und Domänen direkt auf mögliche NES-Funktionen hin zu durchmustern. Die NES-Bibliotheken wurden so generiert, dass die enthaltenen Fragmente das Hefegenom theoretisch dreifach abdecken. Bei der Suche nach neuen Exportsequenzen mit Hilfe des funktionellen NES-Assay wurden insgesamt 77 komplementationsfähige Bibliotheksplasmide erhalten. Die gefundenen 77 NES-Kandidaten können in zwei Gruppen eingeteilt werden: 22 Kandidaten tragen eine Fusion mit einer Proteindomäne im korrekten Leseraster (“in frame” NES-Kandidaten), die restlichen 55 Kandidaten tragen Fragmente mit verschobenem oder inversem Leseraster bzw. Fragmente aus intergenen Regionen (“out of frame” NES-Kandidaten). Alle Proteinsequenzen der 77 identifizierten NES-Kandidaten finden sich im Anhang dieser Arbeit. Die 55 “out of frame” NES-Kandidaten wurden nach der Stärke der vermittelten *Δnmd3*-Komplementation und der Lokalisierung des durch das Bibliotheksplasmid kodierten Fusionsproteins eingeteilt. 32 davon zeigen eine vollständige *Δnmd3*-Komplementation und eine wiederhergestellte zytoplasmatische Lokalisierung des GFP-Fusionsproteins. Ein Sequenzvergleich (Abb. 29) der im jeweiligen Bibliotheksplasmid enthaltenen Fragmente ergab bei 18 der “out of frame”

NES-Kandidaten (NEC = NES-Complementation Candidate), die den *Δnmd3*-Phänotyp vollständig komplementieren können, eine sehr gute Übereinstimmung mit dem beschriebenen Sequenzmotiv der Leucin-reichen NES **L-X₂₋₃-(F, I, L, V, M)-X₂₋₃-L-X-(I, L)** (Bogerd *et al.*, 1996). Einige der dargestellten Sequenzmotive wurden mehrmals identifiziert.

	I	L	D	I	R	M	Q	H	I	S	I	S	*	NECs	60, 62, 65, 70
	I	T	V	T	A	F	E	E	L	V	I	*		NECs	45, 46
	I	L	D	I	N	L	K	N	L	S	V	*		NECs	74, 75
I	L	V	I	P	F	I	E	N	L	T	L	*		NECs	25, 28
IPDEGLSAN F	E	L	D	C	T	I	R	L	L	Q	S	C	LCFCPAA...	NEC	42
IPDEGRFFREYV	F	I	V	E	L	L	S	L	L	E	L	F	*	NEC	43
I	Q	L	M	D	L	F	G	A	L	E	L	*		NEC	54
	I	L	V	I	V	L	N	S	L	V	L	G	*	NEC	71
	I	P	D	E	G	L	A	G	L	H	L	Y	*	NEC	23
IGDELKFVKNDF	I	L	I	T	E	F	D	S	L	D	I	S	NSIFKLGD*	NEC	26
	I	P	D	E	G	L	Y	Y	L	T	L	I	LKF*	NEC	31
IPDEGPSSEQTDGESSFS	V	E	A	M	L	L	E	D	L	V	L	V	SE*	NEC	33
	E	L	A	L	K	L	A	G	L	D	I	N		PKI-NES	
	A	L	Q	K	K	L	E	E	L	E	L	D		MAPKK-NES	
	L	Q	L	P	P	L	E	R	L	T	L	D		REV-NES	

Abb. 29: Sequenzvergleich einiger gefundener Fragmente mit den Sequenzmotiven bekannter Leucin-reicher NES-Domänen.

18 “out of frame” NES-Kandidaten zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit dem beschriebenen Konsensusmotiv **L-X₂₋₃-(F, I, L, V, M)-X₂₋₃-L-X-(I, L)** für eine Leucin-reiche NES, wobei einige Kandidaten gleiche Aminosäureabschnitte tragen. Als Vergleich wurden die Sequenzen der NES-Domänen aus PKI, Rev und MAPKK benutzt. Das mehrmals auftretende Motiv IPDEG kommt durch die Verwendung der Fragmente aus der 2-Hybrid FRYL-Bibliothek zustande (Fromont-Racine *et al.*, 1997). Diese Sequenz resultiert aus der Herstellungsmethode der FRYL-Bibliothek und wurde durch die Klonierungsstrategie der für diese Arbeit generierten Bibliothek NESB-0.75 übernommen.

Es stellte sich weiter die Frage, ob die Fragmente der 18 Kandidaten mit einer Sequenzhomologie zur Leucin-reichen NES auch durch Xpo1p exportiert werden. Um dies zu klären, sollte die Lokalisierung der durch die jeweiligen Bibliotheksplasmide kodierten Fusionsproteine im LMB-sensitiven *xpo1*-Hefestamm nach LMB-Behandlung analysiert werden. Die Identifizierung dieser der klassischen Leucin-reichen NES-Sequenz ähnlichen Fragmente ist eine weitere Bestätigung der Funktionalität des entwickelten NES-Assays, obwohl die Fragmente nicht für Proteindomänen kodieren. Allerdings müssen die erhaltenen Ergebnisse der 22 “in frame” NES-Kandidaten genau überprüft werden, da die Möglichkeit besteht, eine Proteinsequenz mit NES-Funktion im Kontext des Bibliotheks-konstrukts im NES-Assay zu identifizieren, die im nativen Volllängenprotein keine Export-Funktion besitzt.

Ein Sequenzvergleich der restlichen “out of frame” Fragmente zeigte keine weiteren auffälligen Sequenzmotivhomologien. Trotzdem ist eine Untersuchung der verbleibenden

Kandidaten sehr interessant, da diese Erkennungssequenzen enthalten können, die zwar von der klassischen NES-Sequenz abweichen aber trotzdem Export über eines der bekannten Exportine vermitteln können. Lokalisierungsstudien dieser Fusionsproteine in unterschiedlichen Exportinmutanten könnten Hinweise auf die beteiligten Exportine liefern und somit zur Aufklärung unbekannter Erkennungsmotive beitragen. Auch biochemische Affinitäts-Aufreinigungen solcher neuer Sequenzmotive zur Überprüfung der Bindungspartner wären zur Aufklärung weiterer Faktoren denkbar.

2.2 Charakterisierung ausgewählter Kandidaten

Von den 22 “in frame” NES-Kandidaten wurden fünf Kandidaten näher charakterisiert, die aufgrund ihrer guten Komplementation des *Anmd3* Phänotyps und der wiederhergestellten zytoplasmatischen Lokalisierung des neu entstandenen Fusionsproteins ausgewählt wurden. Sowohl die gefundenen Bibliothekskonstrukte, die Fragmente aus den Proteinen Bfr1p und Rpn11p tragen, als auch die an GFP fusionierten Vollängenproteine GFP-Bfr1p und Rpn11p-eGFP werden nicht durch das Exportin Xpo1p exportiert. Zusätzlich zeigt Rpn11p-eGFP auch in Mutanten der anderen bekannten Hefe-Exportine *Amsn5*, *Alos1* und *cse1-2* keine Misslokalisierung und verlässt den Kern möglicherweise durch einen bisher noch unbekannten Exportweg. Als fortführende Experimente sollten auch die gefundenen Bibliothekskonstrukte NESTP-*bfr1*(404-471) und NESTP-*rpn11*(288-307) in den Exportinmutanten *Amsn5*, *Alos1* und *cse1-2* auf eine Misslokalisierung der GFP-Fusionsproteine getestet werden. Dadurch kann untersucht werden, ob die in den Bibliothekskonstrukten enthaltenen Fragmente Erkennungssequenzen dieser Exportine darstellen. Desweiteren sind für Rpn11p Lokalisierungsexperimente in bekannten Importin-Mutanten denkbar, da Karyopherine möglicherweise, wie am Beispiel von Msn5p deutlich wird (Yoshida & Blobel, 2001), den Transport in beide Richtungen vermitteln können. Allerdings sollte vor der Durchführung dieser Experimente eindeutig geklärt werden, ob Bfr1p und Rpn11p wirklich aus dem Kern exportiert werden. Dies könnte über Lokalisierungsexperimente in Nukleoporinmutanten, die den Export blockieren, geschehen. Desweiteren könnten durch biochemische Affinitäts-Aufreinigungen der Proteine mögliche Interaktionspartner identifiziert werden.

Die Arbeiten von Lang und Mitarbeitern (2001) beschreiben für Bfr1p eine Assoziation mit Polyribosomen und dem zytoplasmatischen mRNP Komplex. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass Bfr1p eine Rolle im mRNA Metabolismus spielt. Ob der mögliche Export von

Bfr1p durch ein anderes der bekannten Exportine vermittelt wird, müssen entsprechende Experimente in den oben genannten Exportinmutanten klären. Um eine Beteiligung von Bfr1p am mRNA-Metabolismus zu überprüfen, sollte der Export von GFP-Bfr1p auch in bekannten mutierten Komponenten der mRNA-Exportmaschinerie wie z.B. Mex67p oder Mtr2p untersucht werden.

Für die Kandidaten mit Fragmenten aus den Proteinen Scd5p, Nip1p und Rpl5p konnte in dem LMB-sensitiven *xpo1*-Hefestamm (Neville & Rosbash, 1999) eine Misslokalisierung der Bibliothekskonstrukte und des GFP-Fusionsproteins der jeweiligen Gesamtproteine im Kern durch Inhibierung von Xpo1p nach Zugabe von Leptomycin B nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass Xpo1p den Export dieser Proteine vermitteln kann und die Exporterkennungssequenzen in den jeweiligen NES-Kandidaten enthalten sind.

Für Scd5p wird die in dieser Arbeit gefundene NES-Aktivität und Xpo1p Abhängigkeit des Exports durch eine beschriebene 2-Hybrid-Interaktion mit Xpo1p (Ito *et al.*, 2001) unterstützt. Ein Sequenzvergleich der im NES-Assay identifizierten Domäne aus Scd5p ergab eine signifikante Homologie zur klassischen Leucin-reichen NES (Abb. 30). Durch Eingrenzung der funktionellen NES in Scd5p könnte getestet werden, ob das exportkompetente Sequenzmotiv diese Konsensus-NES umfasst. Deletionen der im NES-Assay gefundenen C-terminalen Domäne von Scd5p oder Mutationen in diesem Bereich könnten zum weiteren Verständnis der Funktion des Exportmechanismus von Scd5p beitragen. Allerdings scheint die mögliche NES von Scd5p nicht essentiell für die beschriebene zytoplasmatische Funktion des Proteins in der Endozytose und der kortikalen Actin-Organisation (Chang *et al.*, 2002; Henry *et al.*, 2002) zu sein, da eine NES-lose, C-terminal um 388 Aminosäuren verkürzte Version von Scd5p nur einen temperatursensitiven Wachstumsdefekt hervorruft (Henry *et al.*, 2002). In diesem Bereich befindet sich das im NES-Assay identifizierte Fragment von Scd5p. Leider wurde die Lokalisierung dieses verkürzten Proteins in den Arbeiten von Henry und Mitarbeitern (2002) nicht überprüft. Eine nukleäre Akkumulation würde die NES-Funktion der gefundenen Domäne bestätigen.

S	L	Q	Q	Q	V	D	A	L	Q	I	QYNRRP*	scd5(856-873)p
E	L	A	L	K	L	A	G	L	D	I	N	PKI-NES
A	L	Q	K	K	L	E	E	L	E	L	D	MAPKK-NES
L	Q	L	P	P	L	E	R	L	T	L	D	REV-NES

Abb. 30: Sequenzvergleich der gefundenen putativen NES-Domäne aus Scd5p mit bekannten Sequenzmotiven Leucin-reicher NESs.

Scd5p besitzt im identifizierten Fragment einen Bereich mit hoher Übereinstimmung zum Konsensusmotiv der Leucin-reichen NES. Als Kontrollsequenzen sind die bekannten NES-Motive aus PKI, Rev und MAPKK angegeben.

Für Nip1p konnte durch die durchgeführten Experimente ebenfalls ein Xpo1p abhängiger Exportweg nachgewiesen werden. Der Translationsinitiationsfaktor Nip1p (eIF3c), der mit der kleinen ribosomalen 40S Untereinheit assoziiert vorliegt, ist am Aufbau des polysomalen Prä-Initiationskomplexes beteiligt (Greenberg *et al.*, 1998; Phan *et al.*, 2001; Valasek *et al.*, 2002). Zusammen mit den Proteinen Tif32p, Prt1p, Tif34p und Tif35p bildet Nip1p den Translationsinitiationskomplex eIF3 (Phan *et al.*, 2001; Valasek *et al.*, 2002). Ausserdem wurde Nip1p in einem genetischen “Screen” nach importdefekten Mutanten identifiziert (Gu *et al.*, 1992). Der Zusammenhang der identifizierten Mutante mit dem Importdefekt ist nicht bekannt. Eine Möglichkeit besteht darin, dass Nip1p eine duale Rolle besitzt, mit unterschiedlicher Funktion bei der Proteinsynthese und beim nukleären Import. Einigen anderen Translationsfaktoren, wie z.B. Ssl1p aus *S. cerevisiae*, konnten bereits andere Funktionen neben der Translationsinitiation nachgewiesen werden (Gulyas & Donahue, 1992; Jackson *et al.*, 1994; Shiina *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1990; Yoon *et al.*, 1992). Durch die im Screen gefundene NES-Funktion der Domäne, die nachgewiesene Misslokalisierung von Nip1p-eGFP in der LMB sensitiven *xpo1*-Mutante und der möglichen Beteiligung von Nip1p am Import, könnte es sich bei Nip1p um ein zwischen Zellkern und Zytoplasma pendelndes Protein handeln. Eine Exportdomäne in Nip1p könnte auch eine regulatorische Funktion besitzen. Interessanterweise zeigt die identifizierte Domäne eine signifikante Homologie zu einer N-terminalen Domäne aus Snurportin1 (AS 61-80) (Abb. 31), aber keinerlei Ähnlichkeit zum Konsensusmotiv der ebenfalls von Xpo1p erkannten Leucinreichen NES. Snurportin1 vermittelt als Adapter für Importin- β , den Import von UsnRNPS und wird über Crm1p re-exportiert (Paraskeva *et al.*, 1999).

nip1 (130-149)p	130 ISQAENSDDWLTISNEFDLI
Snurportin1	61 HARRLAEDDWTGMESEEEK

Abb. 31: Die im funktionellen NES-Assay gefundene Export-Sequenz aus Nip1p zeigt Sequenzhomologie zu Snurportin1.

Der als Exportsequenz gefundene Aminosäureabschnitt AS 130-149 aus Nip1p besitzt eine Übereinstimmung zum Sequenzbereich AS 61-80 aus Snurportin1.

Für Snurportin1 wurden bisher keine definierten Exportsignale beschrieben, die eine Homologie zur klassischen Leucin-reichen NES zeigen. Paraskeva und Mitarbeiter (1999) diskutieren, dass die Bindung an Crm1p durch mehrere NES-Domänen in Snurportin1 zustande kommt, die allerdings keine Sequenzhomologien zur klassischen Leucin-reichen NES besitzen. Es könnte sich somit bei dem in Nip1p identifizierten Sequenzbereich um ein neuartiges durch Xpo1p erkanntes Exportsignal handeln, das Sequenzhomologie zu

Snurportin1 zeigt. Deletions- oder Mutationsexperimente in der gefundenen Nip1p-Domäne könnten zur näheren Charakterisierung dieses Exportsignals beitragen. Neben der Charakterisierung der beschriebenen Kandidaten könnte eine Charakterisierung der übrigen gefundenen “in frame” Kandidaten zu weiteren noch nicht identifizierten Exportwegen und den daran beteiligten Signalsequenzen führen.

2.3 Funktion einer möglichen NES in Rpl5p

Aufgrund der Identifizierung der Domäne rpl5(103-197) in dem durchgeführten NES-Assay und der Misslokalisierung von Rpl5p-eGFP und NESTP-rpl5(103-197)p im LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm nach Leptomycin B Zugabe (siehe Ergebnisse Abb. 15 & 18) wurde spekuliert, dass es sich bei Rpl5p um einen weiteren Adapter des Exports der 60S Untereinheit handeln könnte und der im NES-Assay gefundene Sequenzbereich die Bindung an Xpo1p vermitteln könnte. Studien von Ribbeck & Görlich (2001) bieten Hinweise, dass sich die Anwesenheit mehrerer aktiver Transportsignale in großen zu transportierenden Partikeln positiv auf die Transportrate auswirkt. Es ist somit nicht ausgeschlossen, dass weitere noch nicht identifizierte Adaptoren am Export der 60S Untereinheit beteiligt sind. Rpl5p könnte hierbei durch die identifizierte NES direkt an Xpo1p binden, dadurch den Export der ribosomalen 60S Untereinheit vermitteln und wäre damit der erste direkte Exportadapter für die 60S Untereinheit. Der durch Gadgil und Mitarbeitern (2001a) und Ho und Mitarbeitern (2000) beschriebene Export der 60S Untereinheit wird durch die Bindung von Xpo1p an die Leucinreichen NESs von Nmd3p und dessen Bindung an das ribosomale Protein Rpl10p vermittelt. Die beobachtete Misslokalisierung von Rpl5p-eGFP in der LMB-sensitiven Mutante nach LMB-Behandlung könnte auch durch die Blockierung des Xpo1p abhängigen Exports der 60S Untereinheit hervorgerufen werden. Allerdings wird der Export von NESTP-rpl5(103-197)p im LMB-sensitiven *xpo1*-Stamm nach Leptomycin B Zugabe ebenfalls blockiert. Dies spricht wiederum für eine in diesem Sequenzbereich enthaltene NES-Funktion und für einen direkten Xpo1p vermittelten Exportweg. Sequenzvergleiche des identifizierten Bereichs mit den bekannten Motiven Leucin-reicher NES-Sequenzen ergaben ausserdem eine hohe Übereinstimmung mit dem Konsensusmotiv der Leucin-reichen NES L-X₂₋₃-(F, I, L, V, M)-X₂₋₃-L-X-(I, L) (Bogerd *et al.*, 1996), die von dem Exportin Xpo1p erkannt wird (Abb. 32).

L	L	I	A	R	R	T	L	Q	K	L	G	L	D	rp15(103-116)p
E	L	A	L	K	L	A	G	L	D	I	N			PKI-NES
A	L	Q	K	K	L	E	E	L	E	L	D			MAPKK-NES
L	Q	L	P	P	L	E	R	L	T	L	D			REV-NES

Abb. 32: Vergleich des gefundenen Sequenzbereiches aus Rpl5p mit bekannten Sequenzmotiven Leucin-reicher NESs.

Als Kontrollen sind die bekannten Motive der NES-Sequenzen aus PKI, Rev und MAPKK angegeben. Rpl5p besitzt einen Bereich mit hoher Übereinstimmung zum Konsensusmotiv der Leucin-reichen NES.

Der einzige deutliche Unterschied zwischen dem Sequenzmotiv der Leucin-reichen NES und der dargestellten Domäne aus Rpl5p findet sich im N-terminalen Bereich. Hier sieht man einen LLI-“Cluster” und anschließend einen vier Aminosäuren langen Zwischenraum zum nächsten Leucin-Rest. Ansonsten besitzen die Aminosäuresequenzen eine hohe Übereinstimmung.

Die Vermutung, dass *S. cerevisiae* Rpl5p ein aktives Exportsignal enthält, wurde zusätzlich durch die Identifizierung einer NES im humanen Homolog von Rpl5p, L5, gestärkt (Rosorius *et al.*, 2000). Die von Rosorius und Mitarbeitern (2000) im humanen L5 gefundene Export-vermittelnde Sequenz LLLARRLL ist der in dieser Arbeit identifizierten kleinsten im NES-Test System funktionellen NES von Rpl5p LLIARRTLQKLGLDE sehr ähnlich. So konnten Rosorius und Mitarbeiter (2000) zeigen, dass dieser Sequenzbereich für den Export von L5 essentiell ist und eine Fusion der oben gezeigten L5-Aminosäuresequenz mit GST (Glutathion-S-Transferase) im Zytoplasma lokalisiert.

Eine Deletion des Bereichs *rp15(101-115)* im Volllängenprotein kann den $\Delta rp15$ Phänotyp nicht komplementieren und das GFP-Fusionsprotein akkumuliert stark im Zellkern, wobei durch Fusion der heterologen PKI-NES an das verkürzte *rp15*-Konstrukt die Funktion nicht wiederhergestellt werden kann. Das PKI-Fusionsprotein zeigt allerdings eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisierung, wodurch gezeigt werden kann, dass der Exportdefekt des deletierten Konstrukts aufgehoben wurde. So muss es durch die Deletion zu einem zusätzlichen Verlust einer weiteren in dieser Domäne verankerten Funktion gekommen sein. Durch die hohe Konservierung des Anfangsbereichs dieser Sequenzfolge auch in Prokaryonten (Abb. 33) wurde vermutet, dass es sich um eine wichtige Domäne für die korrekte Proteinfaltung oder um einen Bindebereich für weitere Bindungspartner handelt. Die Vermutung wird durch die durchgeführte Mutationsanalyse von Rpl5p unterstützt. Denn auch die im Sequenzbereich *rp15(103-108)* (LLIARR) eingeführten Punktmutationen führen zu einem vollständigen Funktionsverlust und zur starken nukleären Akkumulation des GFP-Fusionsproteins. Auch bei diesen Mutationen kann eine Fusion mit der PKI-NES zwar die zytoplasmatische Lokalisierung wiederherstellen, der Funktionsdefekt bleibt aber bestehen.

L5_Sc	1	MAFQKDAKSSAYSSRFQTPFRRRREGKTDYYQRKRLVTOHKAKYNTPKYRLVVRFTNEDI
L5_Sp	1	MEFIKAVKSSPYESSRYQTKYRRRREGKTDYYARKRLTAQAKNKYNAPKYRLVVRFSNRFV
L5_Nc	1	MAFHKLKNSAYSSRFQTKYRRRREGKTDYYARKRLTAQAKNKYNAPKYRLVVRFTNEDI
L5_Xl	1	GFVVKVKNKAYEKRYQVFRRRRREGKTDYYARKRLVTDKNKYNTPKYRMIVRVNTNEDI
L5_Dm	1	MGEVVKVKNKQYKRYQVFRRRRREGKTDYYARKRLVTDKNKYNTPKYRLVRLSNEDI
L5_Hs	1	MGEVVKVKNKAYEKRYQVFRRRRREGKTDYYARKRLVTDKNKYNTPKYRMIVRVNTNEDI
L5_Mm	1	MGEVVKVKNKAYEKRYQVFRRRRREGKTDYYARKRLVTDKNKYNTPKYRMIVRVNTNEDI
L18_Ec	1	MAKLHDYKDEVVKKLMTEFNYSVMQVP-----RVEKITLNMGV
L18_Mv	1	MIQAQN-----AKHRVFPFRRRREGKTDPROLGLLISGKP-----RLVARKSLNNI
L18_Ss	1	MNKLANG-----PNMKVFPFRRRREGKTNYYKRYVYISKQT-----RFIVRITNKYV
L18_Stp	1	MISKPDKNKIROQRHRRVFGKLSGTADRP-----RLNVRSTGTI
L18_Hm	1	-----GKRRRRR-KRLRVRRKLKGTAPER-----RLVVRSSNKHI
L5_Sc	61	ICQIISSTITGDVVLAAAYSHELPR-YGITHGLTNWAAAYATGLLIARR L K GLD IY
L5_Sp	61	TCQIVSSRVNGDVLAAHSSSELPR-YGIKWGLANWTAAYATGLLVARRALAKVGLADKY
L5_Nc	61	TCQIVSSEITGDKVFASAYSHELKA-YGIEHGLTNWAAAYATGLLLARRVLKGLGDETF
L5_Xl	60	ICQIAYARIEGDMIVCAAYAHLEPK-YGIKVGLTNWAAAYCTGLLLARRLLNKGFLDKVY
L5_Dm	61	TCQIAYARIEGDRVVCAYASHLEPK-YGIQVGLTNWAAAYCTGLLVARRVLNKGFLDSLY
L5_Hs	61	ICQIAYARIEGDMIVCARYAHLEPK-YGVKVGLTNWAAAYCTGLLLARRLLNKGFLDKIY
L5_Mm	61	ICQIAYARIEGDMIVCAAYAHLEPK-YGVKVGLTNWAAAYCTGLLLARRLLNKGFLDKIY
L18_Ec	41	GEALADKLLDAAADLAISGQKP-LITKARKSVAQFKIROGYPICCKVTLF-----
L18_Mv	47	TAQIMAYDEKGDIVLVSAHSREITVK-MCYKGHCGNLPAAAYLTGLLLGKKA V-E-----
L18_Ss	48	TVQIAKIDPKGDIIMIASAHSALAKKIGWKGDENNTPAAYLTGYLACIRAT-K-----
L18_Stp	41	YAOVIDDVAGVTIASASTLKDVS-K-----TKTECAVVVGKLVAFRAVAK-----
L18_Hm	36	YAOIIDDTKGCTIVSASTLSKELKK-YGLKGGINNTAAAYLVGLLLAKRALKK-----
L5_Sc	120	KGVVEVPEGEYELTEAVE--DGPR-PFKVELDGLORTTG RVFGALKGA DGGGL VPHS
L5_Sp	120	EGVTEPEGEFELTEATE--DGPR-PFKVELDVGLKRTSTGSRVFGAMKGASDGGGLFIPHS
L5_Nc	120	KGVVEADGEYKLTEAAETDDGERRPEKAELDVGLARTSTGARVFGAMKGASDGGGFIPHS
L5_Xl	119	EGQVEVTGDEYNVESID--GEPG-AFTCYLDAGLTRTTTGNKVFALKGAVDGGGLSIPHS
L5_Dm	120	ACCTEVTGEEFNVEPVD--DGPG-AERCELDVGLARTTTGARVFGAMKGAVDGGGLNIPHS
L5_Hs	120	EGQVEVTGDEYNVESID--GEPG-AFTCYLDAGLTRTTTGNKVFALKGAVDGGGLSIPHS
L5_Mm	120	EGQVEVNGGEYNVESID--GEPG-AFTCYLDAGLTRTTTGNKVFALKGAVDGGGLSIPHS
L18_Ec	93	-GERMW-----EEFERLITIAVPRIIDFRGLSAKSFDGRGNYSM
L18_Mv	98	EGIEE-----AILDKGLHRA TKGAATFAVLKGA LDAGMDITPCG
L18_Ss	100	RGVTE-----CVADTGLHVP SKCNRVFYVTKGALDAGLKIEIG
L18_Stp	87	-GISE-----VVFDRGGYLYHG--RVKALADAARNGLKF---
L18_Hm	88	-GIAV-----VVFDRGGYKYHG--RVFALAKGAREAGLKF---
L5_Sc	177	ENRFPGWDET EIDEELRS YIFGGHVSQYMEELADDEERSELEFKGYLADDIDADSL
L5_Sp	177	PNRFPGEDIEEELDDETLRKYIYGGHVAEYMEMLIDDEERYQKQFSGLIADGIESDOL
L5_Nc	180	ENRFPGYDMESEELDAETLKKYIFGGHVAEYMETIADDEERYKSOENRYIEDDLADGL
L5_Xl	176	TKRFPGYDSESKFNPVHRKHIFAQNVAEYMRLLMEDEDAYKKQFSQYIKNGVTADQV
L5_Dm	177	VKRFPGYSAETKSFNADVHRHIFGQHVADYMRSLMEDEESKKRQFSRYIKLGIRADDL
L5_Hs	177	TKRFPGYDSESKFNADVHRKHIMQONVADYMRYLMEDEDAYKKQFSQYIKNSVTPDMM
L5_Mm	177	TKRFPGYDSESKFNADVHRKHIMQONVADYMRYLMEDEDAYKKQFSQYIKNSVTPDMM
L18_Ec	131	GVR-----EQIIFPEIDYDKVDRVRLDITITTAKSDEEGRALLAEDFPFRK-
L18_Mv	136	-----EELIADEER--LNGTHIKQYAEILK-EDEEAYKKQFSKYLEKGINPEDI
L18_Ss	138	-----DISIEND-R--TKGEHIAKYAEKLSKENSPLYSKLFSRYLQRLNPNL
L18_Stp		-----
L18_Hm		-----
L5_Sc	237	EDITYSAHEAIRADPAFKPTE---KKFTKEQYAAESKKYROTCLSKEEAAARVAAKIAALAGQO
L5_Sp	237	EDIYAEAYKIREDESFQKSG----KDAAAEKAESLKHOTKLTAEERKERFNAKVIEAGRA-
L5_Nc	240	EDIYAEAAHAIREDP-FKKAESEAPKKTKEEKAESLKYKSKLTREQAAQVQERIAALRSE-
L5_Xl	236	EDLYKKAHAGIRENPVHEKKPKKE--VKKKRNRAKLSLEOKKDRVAQKASFLRAQEKADS--
L5_Dm	237	EDIYKKAHQAIRNDPTHKVTAKKSSAVTKKRNNAKLTNEOKTKIAAKAAYVAKLOSETEA-
L5_Hs	237	EEMYKKAHAAIRENPVYEKKPKKE--VKKKRNRPKMSLAOKKDRVAQKASFLRAQERAAES-
L5_Mm	237	EEMYKKAHAAIRENPVYEKKPKRE--VKKKRNRPKMSLAOKKDRVAQKASFLRAQERAAES-
L18_Ec		-----
L18_Mv	182	PEHSEELKCKILNL-----
L18_Ss	184	PSHSEELNKIKSSGG-----
L18_Stp		-----
L18_Hm		-----

Abb. 33: Sequenzvergleich der Rpl5p Homologen in eukaryontischen und prokaryontischen Zellen.

Die Proteinsequenzdaten sind der EuGenes- bzw. YPD-Datenbank entnommen (siehe Material und Methoden 3.). Der Sequenzvergleich wurde mit ClusalW 1.8 durchgeführt und mit Boxshade 3.21 dargestellt. Die kleinste im NES-Test System funktionelle Domäne von Rpl5p aus *S. cerevisiae* ist rot gefärbt. Das identifizierte Fragment aus dem NES-Assay ist blau gekennzeichnet. Abkürzungen: Eukaryonten: Sc: *S. cerevisiae*; Sp: *S. pombe*; Nc: *N. crassa*; Xl: *X. laevis*; Dm: *D. melanogaster*; Hs: *H. sapiens*; Mm: *M. musculus*; Prokaryonten: Ec: *E. coli*; Mv: *M. vanniellii*; Ss: *S. solfataricus*; Stp: *S. pyogenes*; Hm: *H. marismortui*

Dadurch dass der Sequenzabschnitt LLIARR zudem in allen bekannten 5S rRNA bindenden Proteinen konserviert ist (Deshmukh *et al.*, 1995), wurde vermutet, dass es sich möglicherweise um eine zusätzliche 5S rRNA Bindestelle in Rpl5p handelt. Allerdings wurden bisher nur Bindestellen der 5S rRNA in den C- und N-terminalen Bereichen von Rpl5p beschrieben (Deshmukh *et al.*, 1995). Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die deletierte Form von Rpl5p *rpl5* Δ (101-115)p-eGFP weiterhin mit der 5S rRNA in einem Saccharosedichtegradienten colokalisiert. Hierbei kommt es zu einem signifikanten Shift des Proteins und der colokalisierenden 5S rRNA im löslichen Bereich des Gradienten. Die 5S rRNA scheint somit zu einem gewissen Anteil an das Protein *rpl5*(Δ 101-115)p-eGFP binden zu können. Ob diese Bindung allerdings genauso stark ist wie in der isogenen Wildtypsituation, lässt sich aufgrund der durchgeführten Experimente nur schwer beurteilen. Der durch Mutation der hydrophoben Leucin-Reste L110 und LL113,115 in *rpl5*(103-197) hervorgerufene Wachstumsdefekt wird wie gezeigt durch Fusion mit der heterologen PKI-NES noch verstärkt, wobei die zytoplasmatische Lokalisierung des Fusionsproteins wieder vollständig hergestellt werden kann. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass eine nicht regulierte NES das mutierte Rpl5p vor Bindung an die 5S rRNA und dem Einbau in die 60S Untereinheit im Kern sofort nach dem Import wieder ins Zytoplasma exportiert. Es sollte zu einem Assemblierungsdefekt der 60S Untereinheit kommen. Dass dies tatsächlich der Fall ist, zeigt der Saccharosedichtegradienten in Abbildung 27 (Ergebnisse). Fusioniert man die unregulierte PKI-NES an ein Wildtyp-Rpl5p, so kommt es allerdings nur zu einem Wachstumsdefekt bei niedrigen Temperaturen wie 16°C. Dieser könnte durch eine Verlangsamung des Stoffwechsels der Zellen bei niedriger Temperatur und einer dadurch verringerten Ribosomenbiogenese hervorgerufen werden. Durch den verlangsamten Stoffwechsel könnte ein durch die PKI-NES hervorgerufener, nicht regulierter Export von Rpl5p zu einer Depletion von Rpl5p im Kern führen. Bei normaler Wachstumstemperatur von 30°C scheint dieser PKI-NES vermittelte Exporteffekt nicht stark genug zu sein.

Handelt es sich also bei der gefundenen Domäne um eine NES, die einen Xpo1p abhängigen Export vermitteln kann? Der Aminosäurebereich *rpl5*(103-197) und auch das verkürzte Fragment *rpl5*(103-117) erfüllen Kriterien einer funktionellen NES. Sie bringen ein nukleäres Protein (*nmd3* Δ NES1+2p-eGFP) wieder ins Zytoplasma und wirken somit in einem anderen Proteinkontext als Exportsignal. Punktmutationen der hydrophoben Leucin-Reste im kleinsten funktionellen NES-Fragment *rpl5*(103-117) blockieren den Export des Vollängenproteins und auch die NES-Funktion des Aminosäurebereichs im NES-Assay

geht durch die Mutationen verloren. Dies zeigt, dass die Sequenzfolge eine Xpo1p abhängige Export-Funktion enthält, die durch Mutationen der konservierten hydrophoben Aminosäurereste blockiert werden kann.

Ein guter biochemischer Hinweis, ob die NES im Kontext des Gesamtproteins als Exportsignal wirken kann, wäre die Demonstration einer direkten Interaktion zwischen Rpl5p und Crm1p *in vitro* in Abhängigkeit der Integrität der NES. Leider konnte dieses Experiment nicht durchgeführt werden, da sich Rpl5p nicht heterolog in *E. coli* exprimieren liess.

Ob die in Rpl5p enthaltene NES-Sequenz als zusätzlicher Adapter für den Export der 60S Untereinheit wirkt, konnte durch die gezeigten Experimente nicht geklärt werden. Es wurden zusätzlich genetische Studien einer Kombination aus mutiertem *NMD3*- und *RPL5*-Allelen in einem Doppeldisruptionsstamm ($\Delta nmd3$ p*URA3-NMD3* $\Delta rpl5$ p*URA3-RPL5*) durchgeführt, wobei es allerdings zu keiner synthetischen Letalität kam (Daten nicht gezeigt). Dies spricht gegen die Rolle von Rpl5p als zusätzlicher Adaptor, da für eine Kombination zweier mutierter Adaptoren des Exports der 60S Untereinheit ein synergetischer Wachstumsdefekt der Zellen erwartet würde. Es sollten allerdings noch Kombinationen weiterer mutierter Allele untersucht werden, um sicher eine synthetisch letale Beziehung ausschließen oder bestätigen zu können.

Eine andere Möglichkeit einer NES-Funktion in L5/Rpl5p wäre ein unabhängig vom Export des 60S Partikels vermittelter Export der 5S rRNA ins Zytoplasma. In *Xenopus* Oozyten konnte gezeigt werden, dass 5S rRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert wird, um dort an spezifischen Speicherorten aufbewahrt zu werden. Der Export der 5S rRNA kann entweder durch den Transkriptionsfaktor TFIIIA oder L5 vermittelt werden (Allison *et al.*, 1995; Guddat *et al.*, 1990). Sollte mehr 5S rRNA im Zellkern für die Synthese der ribosomalen Untereinheiten benötigt werden, wird die im Zytoplasma gespeicherte 5S rRNA in den Kern re-importiert. Im Unterschied zum nukleären Export scheint der Re-Import der 5S rRNA nur durch L5 vermittelt zu werden (Allison *et al.*, 1991; Murdoch & Allison, 1996; Rudt & Pieler, 1996). So konnte gezeigt werden, dass L5 der intrazelluläre Transportfaktor der 5S rRNA in *Xenopus* ist. Allerdings gibt es bisher in Hefe keine Hinweise auf einen separaten Export der 5S rRNA durch Rpl5p oder auf zytoplasmatische Speicherorte für die 5S rRNA, wie er für *Xenopus* Oozyten während der Oogenese beschrieben wurde (Claußen *et al.*, 1999).

Ein generelles Problem der möglichen NES-Funktion in Rpl5p ist die Regulation der Zugänglichkeit dieses Sequenzbereiches durch das Exportin. Da die Synthese von Rpl5p im Zytoplasma stattfindet, bevor das Protein in den Kern importiert und dort nach der Bindung an die 5S rRNA in die 60S Untereinheit eingebaut wird, sollte eine mögliche NES, die am Export des 60S Partikels beteiligt ist, erst nach Assemblierung für das Exportin zugänglich sein. Ansonsten würde Rpl5p unkontrolliert wieder re-exportiert werden und könnte seine Aufgabe im Kern bei der Ribosomenbiogenese nicht mehr erfüllen.

In einem berechneten Strukturmodell des 80S Partikels in *S. cerevisiae* (Spahn *et al.*, 2001) wurde die Lage von Rpl5p (rot markiert in Abb. 34) in der 60S Untereinheit gezeigt.

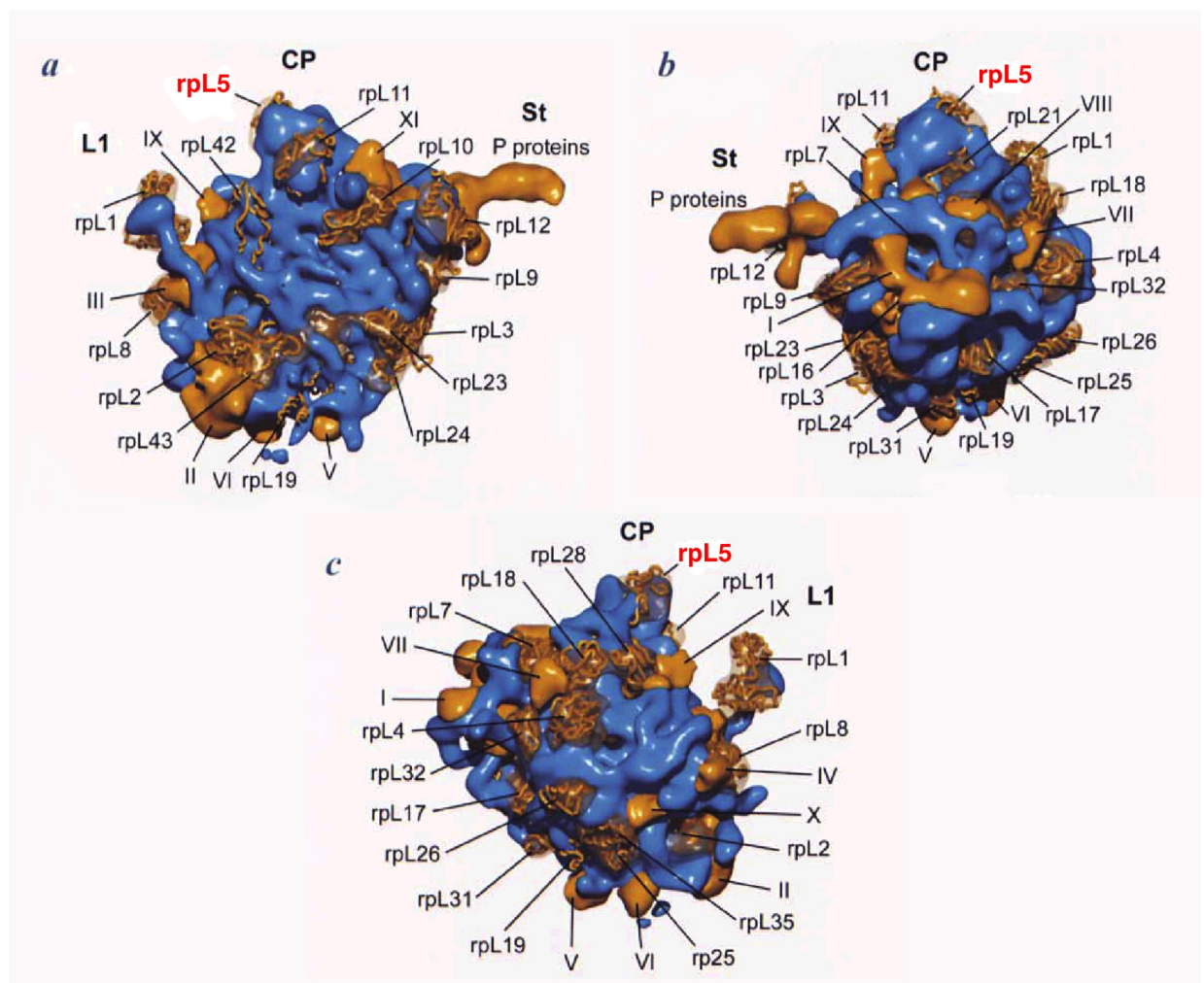


Abb. 34: Schematische Darstellungen der Struktur der ribosomalen 60S Untereinheit von *S. cerevisiae* nach Spahn und Mitarbeitern (2001).

Die 60S Untereinheit ist in der klassischen Kronenansicht (a), aus Sicht der Rpl7p/Rpl12p Seite (b) und aus Sicht der Rpl1p Seite gezeigt. Die am Aufbau des 60S Partikels beteiligten rRNAs sind in blau dargestellt, die Proteine in orange. Die Struktur wurde basierend auf einer cryo-EM Struktur des ribosomalen 80S Partikels aus *S. cerevisiae* erstellt (Spahn *et al.*, 2001). Durch eine anschließende Berechnung der jeweiligen Positionen der Komponenten der bekannten Röntgenstruktur des 70S Partikels aus *H. marismortui* (Ban *et al.*, 2000) wurde die Lage der RNAs und der Proteine überprüft. Proteine sind mit ihren Namen in der Struktur angegeben. Rpl5p ist rot beschriftet. Es ist ersichtlich, dass Rpl5p an der Oberfläche des 60S Partikels liegt. Zusätzlich befindet sich der gefundene Aminosäurebereich in einer exponierten Lage (siehe hierzu auch Abb. 36).

Abbildung 34 zeigt die schematische Darstellung aus drei verschiedenen Perspektiven. Wie man sieht liegt Rpl5p an einer exponierten Stelle im 60S Partikel. Durch die Lage an der Oberfläche der 60S Untereinheit könnte ein Exportin an Rpl5p binden.

Wenn man nun die Lage der gefundenen Domäne im Rpl5p Proteinkontext analysiert (Abb. 35) zeigt sich, dass das kleinste im NES-Assay funktionelle Fragment rpl5(103-117) (roter Strukturbereich) zwar auf der Oberfläche des 60S-Partikels, aber die mögliche Export-Erkennungssequenz relativ geschützt vorliegt. Im Stereobild (Abb. 35) ist zu erkennen, dass die rot eingezeichnete, kleinste funktionelle NES-Sequenz im Proteinkontext sterisch abgeschirmt ist.

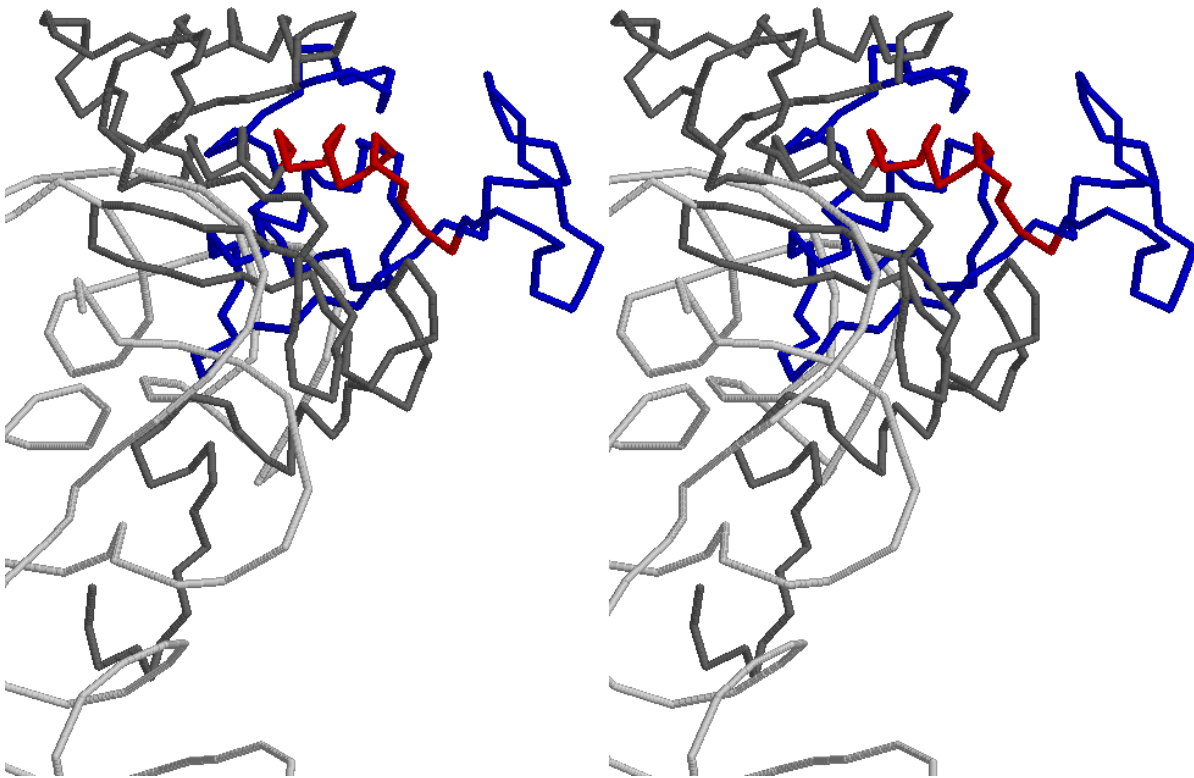


Abb. 35: Rpl5(103-117) liegt relativ geschützt im Proteinkontext vor.

Stereobild der berechneten Struktur von Rpl5p (dunkelgrau, blau, rot) gebunden an 5S rRNA (hellgrau). Der rot + blau markierte Bereich rpl5(103-197) wurde als Domäne im NES-Assay identifiziert. Das kleinste funktionelle NES-Fragment rpl5(103-117) (LLIARRTLQKLGLDE) wurde rot eingefärbt (siehe auch Abb. 33 Sequenzvergleich). Die Sequenzdaten stammen aus der Brookhaven-Datenbank (siehe Material & Methoden 3.). Basierend auf einer cryo-EM Analyse des Hefe-80S Partikels und der bekannten Daten des 70S Partikels aus *H. marismortui* (Ban *et al.*, 2000) wurde eine mögliche Struktur berechnet (Spahn *et al.*, 2001). Das Stereobild wurde mit dem Programm RasMol generiert.

Durch die Lage der identifizierten Rpl5p NES-Sequenz könnte ein Exportin nur in der Orientierung der Blickrichtung angreifen und binden. Diese Restriktion der Bindung des Exportins könnte für die oben erwähnte Regulation des nukleären Exports sinnvoll sein,

indem z.B. der Bereich durch einen bisher noch nicht identifizierten Kofaktor besser zugänglich gemacht werden könnte. In diesem Modell bestätigt sich zusätzlich, dass es im Bereich der in allen 5S rRNA bindenden Proteinen konservierten Sequenz (LLIARR; linke Hälfte des rot markierten Bereichs) zu keinem Kontakt der 5S rRNA (hellgrau) mit Rpl5p kommt. Allerdings gehen diese Strukturdaten aus einer Berechnung eines 3D-Modells basierend auf cryo-EM-Daten des 80S Partikels und bekannten Strukturkoordinaten des 70S Partikels aus *H. marismortui* hervor (Ban *et al.*, 2000; Spahn *et al.*, 2001) und sind deshalb nur als grobes Modell zu benutzen. Die tatsächliche Lage der Aminosäurereste würde eine Röntgen-Kristall-Struktur-Analyse des Hefe-RNPs erfordern.

Durch den in dieser Arbeit entwickelten und durchgeführten funktionellen NES-Assay konnten mehrere Signalsequenzen mit einer NES-Funktion identifiziert werden. Nachdem die aktive Exportfunktion im NES-Komplementations System nachgewiesen wurde, sollte nun die Funktion im jeweiligen Volllängenkontext analysiert werden. Die nähere Charakterisierung der identifizierten Exportsignale und der Volllängen-Exportsubstrate könnte zum Verständnis neuer Exportmechanismen im nukleozytoplasmatischen Transport beitragen.

MATERIAL & METHODEN

1. Material

1.1 Labormaterialien

Chemikalien zur Herstellung von Gelen, Lösungen, Medien und Puffern wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen CARL ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, D), FLUKA (Neu-Ulm, D), GIBCO BRL (Gaithersburg, MD, USA), MERCK (Darmstadt, D) und SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (Steinheim, D) bezogen. Restriktionsenzyme und Enzyme zur Modifikation von Nukleinsäuren stammten von MBI FERMENTAS (St. Leon-Rot, D), NEB (Frankfurt/Main, D) und ROCHE (Mannheim, D). Als DNA-Größenstandard wurde die Gene ruler™ 1 kb DNA-Leiter von MBI FERMENTAS (St. Leon-Rot, D) verwendet. Als Protein-Größenstandard wurde die Benchmark ladder der Firma GIBCO BRL (Gaithersburg, MD, USA) benutzt. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit dem QiaprepSpin MiniprepKit der Firma QIAGEN (Hilden, D) bzw. mit Nucleobond AX der Firma MACHEREY-NAGEL (Düren, D) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur DNA-Isolierung aus Agarosegelen wurde der Qiaquick Gelextractionkit der Firma QIAGEN (Hilden, D) benutzt. Synthetische Oligonukleotide wurden von INTERACTIVA (Ulm, D) bezogen. Auftragssequenzierungen wurden von den Firmen MEDIGENOMIX (München, D) und TOPLAB GMBH (München, D) durchgeführt.

1.2 Verwendete Plasmide

Für Klonierungen wurden die *E. coli*-Stämme DH5 α [F^+ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZY A-argF) U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17* (r_k^- , m_k^+) *supE44* λ^- *thi-1* *gyrA96* *relA1*] der Firma STRATAGENE (LaJolla, Ca, USA) und JM109 [F' *traD36* *proA* $^+$ *B* $^+$ *lacI* q Δ (lacZ)M15 / $e14^-$ (*McrA* $^-$) Δ (lac-*proAB*) *endA1* *gyrA96* (*Nal* r) *thi-1* *hsdR17* (r_k^- m_k^+) *glnV44* *relA1* *recA1* *dam* $^-$] der Firma MBI FERMENTAS (St. Leon-Rot, D) verwendet.

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet. Bei nicht selbst erstellten Plasmiden ist die Referenz angegeben. Die Konstruktion bisher unveröffentlicher Plasmide ist im Folgenden beschrieben.

Zur Herstellung von pNOPGFPA1A-RPN11/pNOPGFPA1L-RPN11 und pNOPGFPA1A-SCD5/pNOPGFPA1L-SCD5 für Lokalisierungsexperimente dieser Proteine, wurde das offene Leseraster (ORF) von *RPN11* bzw. *SCD5* aus genomischer DNA durch PCR amplifiziert. Hierbei wurden eine *NsiI*-Schnittstelle am 5'- und eine *PstI*-Schnittstelle am 3'-Ende des *RPN11* ORFs eingeführt. Das PCR-Produkt für die Klonierung von N-terminal an GFP fusionierten SCD5p hatte *NsiI*-Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende. Die geschnittenen PCR-Produkte wurden in die mit *NsiI* kompatible *PstI*-Schnittstelle von pNOPGFPA1A bzw. pNOPGFPA1L (Hellmuth *et al.*, 1998) kloniert.

pRS316-NIP1, pRS316-RPN11 und pRS316-SCD5 wurden durch PCR-Amplifizierung des jeweiligen ORFs mit je 500 bp stromauf- und stromabwärts hergestellt. Hierbei wurden gleichzeitig 5' eine *BamHI* und 3' eine *XhoI* Erkennungssequenz eingeführt und dieses Fragment wurde in die gleichen Schnittstellen von pRS316 (Sikorski & Hieter, 1989) ligiert. Die Funktionalität der Konstrukte wurde durch Komplementierung des jeweiligen Disruptions-Hefestamms getestet.

pRS313-CRM1-HA und pRS313-crm1-T539C-HA wurden durch Umklonierung eines den jeweiligen ORF enthaltenden *PvuII* Fragments aus pRS315-CRM1-HA bzw. pRS315-crm1T539C-HA (Neville & Rosbash, 1999) in den *PvuII* geöffneten Vektor pRS313 (Sikorski & Hieter, 1989) erhalten.

Das für die Klonierung der benutzten NES-Bibliotheken, der Kontrollen des NES-Assays und die Charakterisierung der möglichen *RPL5*-NES benutzte Plasmid pRS315-nmd3ΔNES1+2-eGFP_LCS (LCS: library cloning site) (Klonierung siehe 1.3) wird im Folgenden mit NESTP (für NES-Test Plasmid) abgekürzt. So würde zum Beispiel die Bezeichnung NESTP-PKI für das Plasmid pRS315-nmd3ΔNES1+2-eGFP-PKI stehen.

Die Kontroll-Plasmide, die für die Überprüfung der Funktionalität des NES-Assays generiert wurden NESTP-Rev-NES, NESTP-m10-rev, NESTP-PKI, NESTP-nmd3-NES1, NESTP-nmd3-NES1+2, NESTP-Fragment, sowie die Plasmide mit einklonierten ORFs mit bekannten oder vermuteten Exportsignalen NESTP-YRB1, NESTP-yrb1-RBD, NESTP-mex67-C, NESTP-MTR2, wurden alle nach der gleichen Klonierungsstrategie hergestellt. Die jeweiligen Fragmente wurden als PCR-Produkte mit *BamHI*-Restriktionsstellen am 5'- und 3'-Ende amplifiziert (bei *MTR2* *BglII*-Schnittstellen, da eine interne *BamHI*-Schnittstelle in *MTR2* vorhanden ist). Das *BamHI* (bzw. *BglII*) geschnittene PCR-Fragment wurde in das mit *BclI* geöffnete Plasmid pRS315-nmd3ΔNES1+2-eGFP_LCS kloniert. Hierbei wurde das Leseraster von *eGFP* korrekt mit dem Leseraster der Fragmente fortgesetzt, damit es zu einem Fusionsprotein mit *nmd3ΔNES1+2-eGFP* kommt.

Für die Analyse der zellulären Lokalisierung von *RPN11*, *SCD5*, *NIP1* und *RPL5* wurden folgende Plasmide hergestellt: pRS315-*RPN11*-eGFP, pRS315-*NIP1*-eGFP, pRS315-*SCD5*-eGFP und pRS315-*RPL5*-eGFP. Hierfür wurden PCR-Fragmente von genomischer DNA amplifiziert, die das jeweilige offene Leseraster (ohne Stopcodon) und ca. 500 bp stromaufwärts des Startcodons als Promotorbereich enthalten. Als Restriktionsstellen wurden 5' eine *SacI* und 3' eine *BamHI* Schnittstelle angehängt. Die nachgeschnittenen PCR-Fragmente wurden jeweils in die gleichen Restriktionsstellen von pRS315-*RPL25*-eGFP (Gadal *et al.*, 2001a) ligiert.

Das für Lokalisierungsexperimente benutzte Plasmid pRS315-*GFP-BFR1* wurde durch Subklonierung des *PvuII*-generierten *GFP-BFR1*-Fragments aus YIPlac211-*GFP-BFR1* (Lang *et al.*, 2001) in die *PvuII*-Schnittstelle von pRS315 (Sikorski & Hieter, 1989) erhalten. Die Plasmide zur Charakterisierung der möglichen NES in Rpl5p NESTP-*rpl5*(103-109), NESTP-*rpl5*(103-111), NESTP-*rpl5*(103-114), NESTP-*rpl5*(103-117), NESTP-*rpl5*(103-124), NESTP-*rpl5*(103-152), NESTP-*rpl5*(103-197), NESTP-*rpl5*(113-152), NESTP-*rpl5*(125-197), NESTP-*rpl5*(153-197), NESTP-*RPL5*, NESTP-*rpl5*(103-197)-*L110D*, NESTP-*rpl5*(103-197)-*LL113,115DD* wurden analog zu den Kontrollen des NES-Assays hergestellt. Dabei wurden PCR-Fragmente der angegebenen Aminosäurebereiche von *RPL5* oder mutiertem *rpl5* mit *BamHI*-Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende generiert und in das *BclI* geöffnete NES-Test Plasmid NESTP unter Einhaltung des Leserasters einkloniert.

Mutationen in Rpl5p wurden wie von Giebel und Spritz (1990) beschrieben eingeführt. Hierbei wurden punktmutierte *SacI/BamHI* PCR-Produkte gegen das *SacI/BamHI* Wildtyp-Fragment aus pRS315-*RPL5*-eGFP ausgetauscht. Als Matrize für die PCR-Reaktionen diente pRS315-*RPL5*-eGFP. So wurden folgende eGFP-fusionierte Rpl5p-Punktmutationskonstrukte angefertigt: pRS315-*rpl5*-*L110D*-eGFP, pRS315-*rpl5*-*LL113,115DD*-eGFP, pRS315-*rpl5*-*LL103,104DD*-eGFP, pRS315-*rpl5*-*TL109,110AA*-eGFP, pRS315-*rpl5*-*RR107,108AA*-eGFP und pRS315-*rpl5*-*LL1103,104,105AAA*-eGFP. pRS315-*rpl5Δ*(101-115)-eGFP beinhaltet eine *RPL5*-interne Deletion von 15 Aminosäuren, wobei die Aminosäurereste gegen eine *BclI* Schnittstelle ausgetauscht wurden. Hierzu wurden zwei PCR-Fragmente von pRS315-*RPL5*-eGFP als Matrize hergestellt (PCR-Fragment1: *rpl5AS100-SacI/BclI*; PCR-Fragment2: *rpl5AS116-BclI/BamHI*), miteinander ligiert und gegen das *SacI/BamHI*-Fragment aus pRS315-*RPL5*-eGFP ausgetauscht. Die Deletion konnte durch die *BclI* Schnittstelle überprüft werden.

Einige der *RPL5*-Mutationen und die Deletion pRS315-*rpl5Δ*(101-115)-eGFP wurden mit den heterologen NES-Fragmenten aus PKI und Rev fusioniert. Hierfür wurde die jeweilige

NES als PCR-Fragment, mit je einer *NcoI*-Schnittstelle am 5'- und 3'-Ende, amplifiziert und in die mit *NcoI* geöffneten Plasmide ligiert. Zur Überprüfung der Orientierung enthielten die PCR-Produkte noch eine zusätzliche *PstI* Erkennungssequenz am 3'-Ende.

pRS315-rpl5-L110D und pRS315-rpl5-LL113,115DD wurden durch Subklonierung der jeweiligen mutierten *SacI/BglII*-Fragmente von pRS315-rpl5-L110D-eGFP bzw. pRS315-rpl5-LL113,115DD-eGFP in dieselben Schnittstellen von pRS315-RPL5-HA (Deshmukh *et al.*, 1995) erhalten.

PLASMID	REFERENZ
pJG4-5-Rev-M10	(Neville & Rosbash, 1999)
pJG4-5-REV-wt	(Neville & Rosbash, 1999)
pNOPGFPA1A	(Hellmuth <i>et al.</i> , 1998)
pNOPGFPA1A-RPN11	diese Arbeit
pNOPGFPA1A-SCD5	diese Arbeit
pNOPGFPA1L	(Hellmuth <i>et al.</i> , 1998)
pNOPGFPA1L-RPN11	diese Arbeit
pNOPGFPA1L-SCD5	diese Arbeit
pRS313	(Sikorski & Hieter, 1989)
pRS313-CRM1-HA	diese Arbeit
pRS313-crm1T539C-HA	diese Arbeit
pRS313-RPL25-eGFP	(Gadal <i>et al.</i> , 2001a)
pRS315	(Sikorski & Hieter, 1989)
pRS315-CRM1-HA	(Neville & Rosbash, 1999)
pRS315-crm1T539C-HA	(Neville & Rosbash, 1999)
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP	(Gadal <i>et al.</i> , 2001a)
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-Fragment	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP_LCS	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-m10-rev	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-mex67-C	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-MTR2	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-nmd3-NES1	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-nmd3-NES1+2	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-PKI	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-REV	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(103-109)	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(103-111)	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(103-114)	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(103-117)	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(103-124)	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(103-152)	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(103-197)	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(113-152)	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(125-197)	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(153-197)	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(103-197)-L110D	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-rpl5(103-197)-LL113,115DD	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-YRB1	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-eGFP-yrb1-RBD	diese Arbeit
pRS315-nmd3 Δ NES1+2-PKI-eGFP	(Gadal <i>et al.</i> , 2001a)
pRS315-NMD3-eGFP	(Gadal <i>et al.</i> , 2001a)
pRS315-rpl5 Δ (101-115)-eGFP	diese Arbeit

pRS315- <i>rpl5</i> Δ (101-115)-PKI- <i>eGFP</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>RPL5-eGFP</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>RPL5-HA</i>	(Deshmukh <i>et al.</i> , 1995)
pRS315- <i>rpl5-HA3</i>	(Deshmukh <i>et al.</i> , 1995)
pRS315- <i>rpl5-HA4</i>	(Deshmukh <i>et al.</i> , 1995)
pRS315- <i>rpl5-L110D</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>rpl5-LL113,115DD</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>rpl5-L110D-eGFP</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>rpl5-L110D-PKI-eGFP</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>rpl5-LL113,115DD-eGFP</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>rpl5-LL113,115DD-PKI-eGFP</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>rpl5-LL103,104DD-eGFP</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>rpl5-TL109,110AA-eGFP</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>rpl5-RR107,108AA-eGFP</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>rpl5-LL1103,104,105AAA-eGFP</i>	diese Arbeit
YIPlac211- <i>GFP-BFR1</i>	(Lang <i>et al.</i> , 2001)
pRS315- <i>GFP-BFR1</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>GFD1-eGFP</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>NIP1-eGFP</i>	diese Arbeit
pRS316- <i>NIP1</i>	diese Arbeit
pRS315- <i>RPN11-eGFP</i>	diese Arbeit
pRS316	(Sikorski & Hieter, 1989)
pRS316- <i>NMD3</i>	(Gadal <i>et al.</i> , 2001a)
pRS316- <i>RPL5</i>	(Deshmukh <i>et al.</i> , 1995)
pRS316- <i>RPN11</i>	diese Arbeit
pRS316- <i>RPS3-eGFP</i>	(D. Strauss, persönliche Mitteilung)
pRS316- <i>SCD5</i>	diese Arbeit

Tab. 4: Verwendete Plasmide.

1.3 NES-Test Plasmid (NESTP)

Zur Herstellung des beim funktionellen NES Assay benutzten NES-Test Plasmids (NESTP, Abb. 36) wurde das durch Gadal und Mitarbeiter (2001a) beschriebene Plasmid pRS315-*nmd3* Δ *NES1+2-eGFP* wie folgt modifiziert:

Das Plasmid pRS315-*nmd3* Δ *NES1+2-eGFP* wurde als Templat für zwei PCR-Reaktionen benutzt. Der gesamte *eGFP*-ORF wurde bis direkt vor das STOP-Codon amplifiziert. Ein zweites PCR-Produkt mit der S20 Terminator Region, ausgehend vom STOP-Codon von *eGFP* bis zum Ende des Terminators, wurde hergestellt. Die zur PCR-Reaktion benutzten Oligonukleotide enthielten zusätzliche Schittstellen. So wurde durch Ligation der mit *NcoI/BclII* und *BclII/SalI* geschnittenen PCR-Fragmente in die ebenfalls *NcoI/SalI* aufgeschnittene und dephosphorylierte Plasmid-DNA pRS315-*nmd3* Δ *NES1+2-eGFP* eine zusätzliche *BclII*-Schnittstelle mit flankierenden *HindIII* und *NheI* Schnittstellen geschaffen. Es wurde somit direkt vor das STOP-Codon von *eGFP* eine Bibliothek-Klonierungsstelle (LCS: Library Cloning Site) inseriert (siehe Abb. 36).

Durch Methylierung der Restriktionserkennungssequenz von *BclII* TGM⁶ATCA durch die *dam*-Methylase in *E. coli* Laborstämmen, wie DH5 α , wird eine Restriktion durch das *BclII* Enzym blockiert. Wenn man mit dieser Restriktionsstelle klonieren möchte muss die Plasmid-DNA aus einem *dam*⁻-*E. coli* Stamm, wie z.B. JM109, isoliert werden.

NES-Test Plasmid (NESTP)

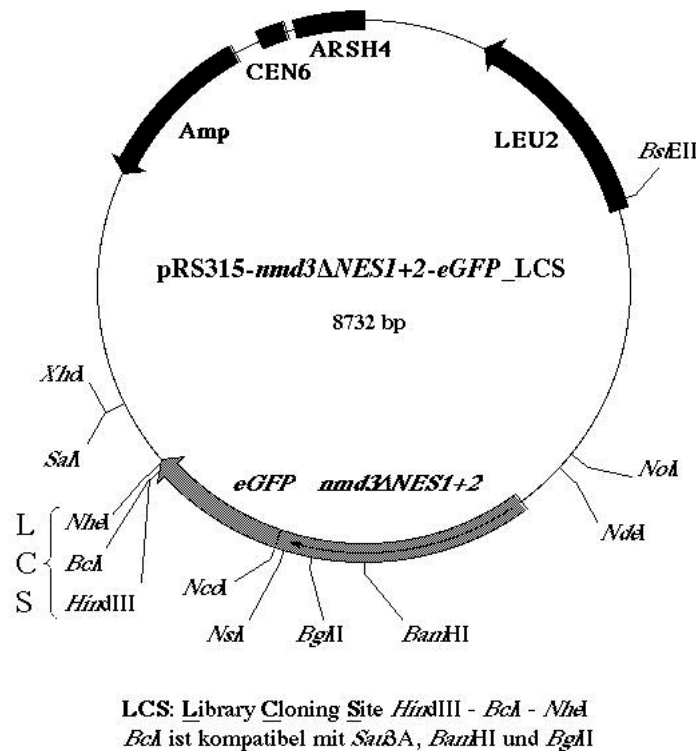


Abb. 36: NES-Test Plasmid (NESTP) für die Klonierung der Bibliotheken und Durchführung des funktionellen NES-Assays.

Erläuterungen zur Klonierung siehe Text.

1.4 Herstellung der Bibliotheken genomischer Hefe-DNA für die Durchführung des funktionellen NES-Assays

Es wurden zwei Bibliotheken mit genomischen Hefe-DNA Fragmenten unterschiedlicher Durchschnittsgröße hergestellt. Eine Bibliothek wurde mit kleineren genomischen Fragmenten erzeugt (von nun an NESB-0.75 genannt; 0.75 steht für die durchschnittliche Größe der enthaltenen genomischen Fragmente in kb; NESB: NES-Assay Bibliothek), die Zweite trägt große Fragmente aus genomischer DNA (von nun an als NESB-2.0 bezeichnet; 2.0 steht für die durchschnittliche Größe der enthaltenen genomischen Fragmente in kb).

1.4.1 Erstellung von NESB-0.75

Als Ausgangs-DNA für die Gewinnung der Fragmente für NESB-0.75 wurde die bereits erfolgreich verwendete 2-Hybrid-Bibliothek FRYL ("Fromont-Racine Yeast Library") benutzt (Fromont-Racine *et al.*, 1997), die genomische Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 900 bp enthält. Bei dieser Bibliothek wurde, wie bei Fromont-Racine und Mitarbeitern (1997) beschrieben, die genomische DNA durch partiellen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* geschnitten und über "Abstandshalter" (sogenannte spacer) in das Grundgerüst inkloniert. Hierbei entstand auf beiden Seiten der Insertionsstelle der genomischen Fragmente eine *Bam*HI-Restriktionsstelle. Diese Schnittstelle wurde benutzt, um die genomischen Fragmente für die in dieser Arbeit benutzten Bibliotheken wiederzugewinnen. Die *Bam*HI verdaute DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und der Bereich zwischen 250 bp und 1.5 kb als Gelstück ausgeschnitten. Nach Isolierung der DNA aus dem Agarosegel wurden die Fragmente in das *Bcl*II geöffnete NES-Test Plasmid pRS315-*nmd3ΔNES1+2-eGFP_LCS* (siehe oben, *Bcl*II Schnittstelle) ligiert. Um eine theoretisch dreifache Abdeckung des Hefegenoms zu erreichen, wurden 270000 *E. coli* Einzeltransformanten vereinigt und die Plasmid-DNA mit dem Nucleobond AX Kit der Firma MACHEREY-NAGEL (Düren, D) isoliert. Plasmid-Präparationen aus Einzeltransformanten und statistische Auswertung ergaben eine durchschnittliche Rate von Fragment tragenden Plasmiden von 92% und eine durchschnittliche Fragmentgröße von 750 bp.

1.4.2 Erstellung von NESB-2.0

Als Ausgangs-DNA für NESB-2.0 diente genomische DNA, die aus dem Wildtypstamm RS453 gewonnen wurde (siehe 2.1.5). Diese DNA wurde mit *Sau3A* partiell über unterschiedliche Zeitspannen (15 s, 30 s, 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 45 min) verdaut. Die verdaute DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und der Bereich zwischen 2 und 6 kb als Gelstück ausgeschnitten. Nach Isolierung der DNA aus dem Agarosegel wurden die Fragmente in das *Bcl*II-geöffnete NES-Test Plasmid pRS315-*nmd3ΔNES1+2-eGFP_LCS* (siehe oben, *Bcl*II Schnittstelle) ligiert. Um eine theoretische dreifache Abdeckung des Hefegenoms zu erreichen, wurden 110000 *E. coli* Einzeltransformanten vereinigt und die Plasmid-DNA mit dem Nucleobond AX Kit der Firma MACHEREY-NAGEL (Düren, D) isoliert.

Plasmid-Präparationen aus Einzeltransformanten und statistische Auswertung ergaben eine durchschnittliche Rate von Fragment tragenden Plasmiden von 90% und eine durchschnittliche Fragmentgröße von 2 kb.

1.5 Verwendete Hefestämme

Die verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Wenn nicht anders angegeben, wurden Hefestämme unter Normalbedingungen gezogen und analysiert. Normalbedingungen bedeuten eine Wachstumstemperatur von 30°C für alle Hefestämme und Lokalisierungsexperimente im Stadium des exponentiellen Wachstums der Hefekultur.

Ein “Shuffle” Stamm ist ein Disruptionsstamm, der mit einem *pURA3*-WT-Plasmid komplementiert wurde. Nach Transformation mit einem zu analysierenden Plasmid wird das Wachstum auf SDC+FOA analysiert. 5'-FOA ist toxisch für Zellen die *URA3* exprimieren und kann dadurch zur negativen Selektion gegen das die Wildtypkopie tragende *URA3*-Plasmid benutzt werden. Die “Shuffle” Stämme von *NIP1*, *RPL5*, *RPN11* und *SCD5* wurden durch Transformation der jeweiligen diploiden EUROSCARF-Stämme (EUROSCARF, Frankfurt/Main, D) mit dem *URA3*-Wildtyp ORF-Plasmid transformiert und sporuliert. Die Sporen wurden auf die notwendigen *KAN*- und *URA3*-Marker, sowie auf Wachstum auf 5'-FOA-haltigem Medium überprüft.

Der “Doppelshuffle” Stamm von *NMD3* und *RPL5* wurde durch Kreuzung des *NMD3* “Shuffle” Stammes (*Δnmd3::KAN pURA3-NMD3*) mit dem *RPL5* “Shuffle” Stamm (*Δrpl5::KAN pURA3-RPL5*) erzeugt. Es handelt sich hierbei um eine Geneticinresistente Spore aus einer Tetrade, in der der *KAN*⁺- und der *kan*⁻-Phänotyp 2:2 segregierten. Beide *KAN*⁺-Sporen konnten nicht auf 5'-FOA-haltigem Medium wachsen. Dies konnte nur durch gleichzeitige Anwesenheit eines *NMD3*- und *RPL5*-Plasmids komplementiert werden.

STAMM	GENOTYP	REFERENZ
RS453	<i>MATa/α, ade2-1/ade2-1, his3-11.55/ his3-11.55, leu2-3.112/ leu2-3.112, trp1-1/ trp1-1, ura3-52/ ura3-52, can1-100/ can1-100, GAL⁺/ GAL⁺</i>	(Wimmer <i>et al.</i> , 1992)
W303-1A	<i>MATa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, can1, GAL⁺</i>	R. S. Fuller
CRM1	<i>MATa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, can1, GAL⁺ xpo1::KAN^r + pLEU2-CRM1-HA</i>	(Neville & Rosbash, 1999)
CRM1 new	<i>MATa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, can1, GAL⁺ xpo1::KAN^r + pHIS3-CRM1-HA</i>	diese Arbeit
CRM1T539C	<i>MATa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, can1, GAL⁺ xpo1::KAN^r + pLEU2-crm1T539C-HA</i>	(Neville & Rosbash, 1999)
CRM1T539C new	<i>MATa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, can1, GAL⁺ xpo1::KAN^r + pHIS3-crm1T539C-HA</i>	diese Arbeit
<i>cse1-2</i>	<i>MATa, cse1::HIS3, ade2-101, trp1-delta901, ura3-52, leu2-3,112, his3-11,15 + pTRP1-cse1-2</i>	(Schröder <i>et al.</i> , 1999)
JWY3740	<i>MATα, ade1, his3, leu2, trp1, rpl5::TRP1 + pURA3-RPL5</i>	(Deshmukh <i>et al.</i> , 1995)
JWY3749	<i>MATα, ade1, his3, leu2, trp1, rpl5::TRP1 + pLEU2-rpl5-HA-3</i>	(Deshmukh <i>et al.</i> , 1995)
JWY3752	<i>MATα, ade1, his3, leu2, trp1, rpl5::TRP1 + pLEU2-rpl5-HA-4</i>	(Deshmukh <i>et al.</i> , 1995)
<i>NIP1/nip1Δ</i> diploid	<i>BY4743 Mata/α, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, lys2Δ0/LYS2, MET15/met15Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, nip1::KAN^r/NIP1 (NIP1 = YMR309C)</i>	EUROSCARF
<i>NIP1</i> “Shuffle”	<i>BY4743 Mata, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, nip1::KAN^r + pURA3-NIP1</i>	diese Arbeit
<i>NMD3</i> “Shuffle”	<i>MATa, his3, leu2, lys2, ura3, nmd3::KAN^r + pURA3-NMD3</i>	□ <i>ADDIN ENRfu</i> □ □ <i>Gadal et al., 2001a</i> □
<i>nup49-313</i>	<i>MATa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, nup49::TRP1 + pLEU2-nup49-313</i>	□ <i>ADDIN ENRfu</i> □ □ <i>Doye et al., 1994</i> □
<i>RPL5/rpl5Δ</i> diploid	<i>BY4743 Mata/(, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, lys2Δ0/LYS2, MET15/met15Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, rpl5::KAN^r/RPL5 (RPL5 = YPL131w)</i>	EUROSCARF
<i>RPL5</i> “Shuffle”	<i>BY4743 Mata, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, rpl5::KAN^r + pURA3-RPL5</i>	diese Arbeit
<i>Δrpl5 pLEU-rpl5-LL113,115DD</i>	<i>BY4743 Mata, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, rpl5::KAN^r + pLEU2-rpl5-LL113,115DD</i>	diese Arbeit
<i>RPN11/rpn11Δ</i> diploid	<i>BY4743 Mata/α, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, lys2Δ0/LYS2, MET15/met15Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, rpn11::KAN^r/RPN11 (RPN11 = YFR004w)</i>	EUROSCARF
<i>RPN11</i> “Shuffle”	<i>BY4743 MATα, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, rpn11::KAN^r + pURA3-RPN11</i>	diese Arbeit
<i>SCD5/scd5Δ</i> diploid	<i>BY4743 Mata/α, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, lys2Δ0/LYS2, MET15/met15Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, scd5::KAN^r/SCD5 (SCD5 = YOR329c)</i>	EUROSCARF
<i>SCD5</i> “Shuffle”	<i>BY4743 MATα, his3Δ1, leu2Δ0, ura3Δ0, scd5::KAN^r + pURA3-SCD5</i>	diese Arbeit
<i>RPL5 NMD3</i> “Shuffle”	<i>BY4743 Mata, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, rpl5::KAN^r nmd3::KAN^r + pURA3-RPL5 + pURA3-NMD3</i>	diese Arbeit
<i>XPO1</i> “Shuffle”	<i>MATa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, can1, GAL⁺ xpo1::KAN^r pURA3-XPO1</i>	(Künzler <i>et al.</i> , 2000)
XPO1	<i>MATα, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, can1, GAL⁺ xpo1::LEU2 + pHIS3-XPO1</i>	(Stade <i>et al.</i> , 1997)
xpo1-1	<i>MATα, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, can1, GAL⁺ xpo1::LEU2 + pHIS3-xpo1-1</i>	(Stade <i>et al.</i> , 1997)
<i>Δlos1</i>	<i>MATa, los1::HIS3, ade2-1, his3-11,15, ura3-52, leu2-3,112, trp1-1, can1-100</i>	(Simos <i>et al.</i> , 1996)
<i>Δmsn5</i>	<i>BY4741, MATa, his3-d1, leu2-d0, met15-d0, ura3-d0, msn5::KAN (YDR335w::KAN)</i>	EUROSCARF

Tab. 5: Verwendete Hefestämme.

2. Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Allgemeine Methoden zur DNA Manipulation

Allgemeine Methoden zur DNA-Manipulation wie Restriktionsverdau von Plasmiden, Ligation von DNA-Fragmenten, Phosphatasebehandlung, Polymerasekettenreaktion (PCR), Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese wurden nach Maniatis *et al.* (1989) durchgeführt.

2.1.2 Mutagenese von Plasmid DNA

Aminosäureaustausch durch gezielte Punktmutagenese auf Plasmid-Ebene wurde durch eine PCR-basierte Methode nach Giebel & Spritz (1990) erzeugt. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden sequenziert, um die Mutation zu überprüfen.

2.1.3 Methoden und Medien für *S. cerevisiae*

Alle allgemeinen Arbeiten mit *S. cerevisiae*, wie Erzeugung von Diploiden, Sporulation und Tetradenanalyse, wurden wie von Sherman (1991) beschrieben durchgeführt. Alle Hefestämme wurden in Standardmedien nach Sherman (1991) gezogen.

Vollmedien enthielten 1% Hefe-Extrakt (DIFCO, Heidelberg, D), 2% Bacto-Pepton (DIFCO, Heidelberg, D) und entweder 2% Glukose (YPD) oder 2% Galaktose (YPG).

Synthetische Kompletmedien enthielten 2% Glukose (SDC) oder 2% Galaktose (SGC), 0,67% Hefe-Stickstoffgrundlage (DIFCO, Heidelberg, D) und 7% des entsprechenden CSM (complete synthetic mix) (QBIOTEC, Heidelberg, D), welches alle nötigen Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen enthält, außer denen, die für die Selektion von auxotrophen Markern (z.B. leu, ura, his *etc.*) nötig waren.

Zusammensetzung von CSM+all [mg/l]: Adenin 10, L-Arginin 50, L-Asparaginsäure 80, L-Histidin-HCl 20, L-Isoleucin 50, L-Leucin 100, L-Lysin-HCl 50, L-Methionin 20, L-Phenylalanin 50, L-Threonin 100, L-Tryptophan 50, L-Tyrosin 50, Uracil 20, Valin 140.

Feste Medien enthielten zusätzlich 2% Agar (FLUKA, Steinheim, D). Wenn nötig, wurde 0,1% 5'-FOA (TORONTO RESEARCH CHEMICALS, Toronto, Cnd) oder 0,2 mg/ml Geneticin (SIGMA, Steinheim, D) zugegeben.

Das Wachstum der Hefezellen wurde durch Messung der optischen Dichte bei $\lambda=546$ nm gegen frisches Medium verfolgt. Dabei entspricht eine OD_{546nm} -Einheit einer Hefezellendichte von ca. $1,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml (Sherman, 1991).

Plasmide wurden mit Hilfe der Lithium-Acetat-Methode nach Itoh *et al.* (1983) in *S. cerevisiae* transformiert.

2.1.4 Plasmid-Rückgewinnung aus *S. cerevisiae*

Plasmid-DNA aus Hefezellen wurde nach der Methode von Robzyk & Kassir (1992) isoliert. Das DNA-Pellet wurde in 50 μ l Wasser resuspendiert und 5 μ l der wiedergewonnenen DNA in elektrokompente *E. coli*-Zellen transformiert.

2.1.5 Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Genomische DNA aus Hefezellen wurde mit dem QiAamp DNA Mini Kit der Firma QIAGEN (Hilden, D) nach Angaben des Herstellers aus dem Wildtyphefestamm RS453 (siehe verwendete Hefestämme) isoliert.

2.1.6 Herstellung eines Hefezellenextraktes

10 ODs (546 nm) Hefezellen einer ü/N-Kultur wurden geerntet und bei RT und 4000 rpm für 4 min abzentrifugiert. Nach dem Resuspendieren der Zellen in 800 μ l H₂O wurde die Zellsuspension in ein 2 ml Eppendorf-Reagiergefäß überführt. Das Zellpellet wurde mit 3/4 Volumen Glaskügelchen, 100 μ l H₂O und 100 μ l 4xProbenpuffer (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 9,2% SDS, 0,2% Bromphenolblau, 40% Glycerin, 100 mM DTT) gemischt. Durch Inkubation für 3 min bei 95°C und anschließendes Vortexen für 10 s wurden die Zellen aufgebrochen. Diese beiden Schritte wurden zweimal wiederholt. Es folgte Zentrifugation für 10 s bei maximaler Geschwindigkeit (14000 rpm) und RT. Anschließend wurden 100 μ l Überstand in ein Eppendorf-Reagiergefäß überführt und 10 μ l auf einem SDS-Gel analysiert.

2.1.7 Wachstumsanalyse von Hefezellen (Dotspot-Analyse)

Hefemedium-Agar-Platten, wie z.B. SDC+FOA oder YPD (siehe Medien), wurden über Nacht bei RT getrocknet. Verschiedene Übernacht-Flüssigkulturen (in Voll- bzw. Selektivmedium, siehe Medien) von Hefezellen wurden auf $OD_{546nm} = 0,5$ in 1 ml Wasser verdünnt, so dass sich die gleiche Anzahl an Hefezellen in allen zu analysierenden Kulturen befindet. Es wurden 1:10-, 1:100-, 1:1000- und 1:10000-Verdünnungen dieser Zellsuspensionen in 100 μ l Wasser angesetzt. Von jeder Verdünnung wurden je 10 μ l (SDC-Platten) oder 6 μ l (YPD-Platten) in einer Reihe auf die Agar-Platten getropft. Das Wachstum der Hefezellen wurde nach ca. 3 Tagen bei entsprechenden Temperaturen (23°C und 30°C) überprüft.

2.1.8 Lokalisierung von Proteinen in der Zelle

Zur Bestimmung der zellulären Lokalisierung von Proteinen wurden entsprechende eGFP Fusionsproteine hergestellt. Die Lokalisierung in exponentiell wachsenden Hefezellen wurde mittels eines Axioskop Mikroskops und/oder eines Axiovert 200M Konfokalmikroskops der Firma ZEISS (Oberkochen, D) bestimmt. Für das GFP-Signal wurde jeweils der Fluoreszenz Filter benutzt. Bilder wurden mit einer XILLIX TECHNOLOGIES CORP. Microimmager CCD Kamera (Richmond, British Columbia, Cnd), bzw. einer ZEISS (Oberkochen, D) HAL100 Digitalkameraeinheit aufgenommen und mit Openlab der Firma IMPROVISION (Coventry, GB) und Photoshop 4.01 von ADOBE SYSTEMS INCORPORATED (Mountain View, CA, USA) prozessiert.

2.1.9 Leptomycin B-Behandlung LMB sensitiver Hefen

Hefezellen, die das Wildtyp *XPO1* und das Leptomycin B-sensitive *xpo1-T539C* Allel exprimieren (Neville & Rosbash, 1999) wurden mit einem zu untersuchenden eGFP-Fusionsprotein transformiert und in Minimalmedium gezogen. Die Behandlung der Zellen für die Lokalisierungsexperimente wurde nach Großhans *et al.* (2001) durchgeführt. Das Leptomycin B wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Yoshida (University of Tokyo, Tokyo, J) zur Verfügung gestellt.

2.1.10 Analyse des 40S und 60S ribosomalen Exports

Zur Analyse des Exports der 60S ribosomalen Untereinheit wurde die Methode nach Hurt und Mitarbeitern (1999) benutzt. Hierbei wird das Rpl25p-eGFP Fusionsprotein als Reporter für die 60S Untereinheit eingesetzt. Zur Untersuchung des Exports der 40S ribosomalen Untereinheit wurde als Reporter das Rps3p-eGFP Fusionsprotein benutzt (Milkereit *et al.*, 2002). Die experimentelle Durchführung der Lokalisierungsstudien beider Reporterproteine erfolgte nach der von Gadgil und Mitarbeitern (2001a) beschriebenen Methode.

2.1.11 Bedingungen des NES-Komplementations-Assay in *S. cerevisiae*

Die für diese Arbeit generierten NES-Assay Bibliotheken NESB-0.75 und NESB-2.0 wurden mit der modifizierten Methode nach Itoh und Mitarbeitern (1983) in den Hefestamm *Δnmd3::KAN* pRS316-*NMD3* (*NMD3* “Shuffle” Stamm) transformiert. Hefetransformanten wurden auf synthetisches Kompletmedium mit Selektion auf den Marker der transformierten Bibliotheksplasmide ausplattiert (SDC-Leu). Diese Platten wurden bei 30°C bis zu einer mittleren Koloniegröße der Hefen inkubiert.

Anschließend wurden die Transformanten auf synthetisches Kompletmedium + 5'-FOA replika plattiert, das eine negative Selektion gegen das *NMD3*-tragende *URA3*-Plasmid erlaubt. Nur Hefetransformanten, die ein Bibliothek-Konstrukt mit einer NES-Funktion enthalten, können in Gegenwart von 5'-FOA wachsen.

Nach Inkubation bei 30°C für 5 Tage wurden die Platten nach wachsenden Hefekolonien überprüft. Diese wurden auf SDC-Leu-Platten umgestrichen.

2.1.12 Methoden und Medien für *E. coli*

E. coli-Stämme wurden in LB-Vollmedium (1% Trypton, 0,5% Yeast Extract, 1% NaCl) bei 37°C kultiviert. Für Selektivmedien wurde Ampicillin oder Kanamycin in einer Endkonzentration von 100 mg/l zugegeben.

Standardmethoden mit *E. coli* wie Plasmidtransformation, Kultivierung, Herstellung elektrokompenter und $MnCl_2$ -kompetenter Zellen wurden nach Maniatis *et al.* (1989) durchgeführt.

Alle Medien wurden vor Benutzung autoklaviert (30 min, 120°C, 1 atm). Feste Medien wurden durch Zugabe von 2% Agar hergestellt und ein pH von ca. 5,5 eingestellt, um eine

Hydrolyse des Agars zu vermeiden. Supplemente und Antibiotika wurden steril filtriert und, wie oben beschrieben, dem autoklavierten Medium zugegeben.

2.2 Biochemische Methoden

Auftrennung von Proteinen mittels SDS Gelelektrophorese, Anfärbung von Proteinen mit Coomassieblau und Westernblot-Analyse wurden nach Maniatis *et al.* (1989) durchgeführt.

2.2.1 RNA Profilanalyse & Sedimentationsanalyse mittels Saccharosedichtegradienten

Zur Herstellung und Fraktionierung von 10 ml 10 - 50% Saccharosedichte-Gradienten in Zentrifugenröhrchen (Polyallomer 14 x 95 mm für Ultrazentrifugenrotor SW40) der Firma BECKMAN INSTRUMENTS GMBH (München, D) wurde ein ProTeam LC Gradienten System der Firma ISCO (Lincoln, Nebraska, USA) nach Angaben des Herstellers benutzt. Hierbei wurden die zur Herstellung der Gradienten benötigten 10 bzw. 50%igen Saccharoselösungen in Puffer A (20 mM HepesKOH (pH 7,5), 10 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl₂) angesetzt.

Eine Kultur von 500 ml des zu analysierenden Hefestammes wurde bei gewünschter Temperatur bis zu einer OD_{546nm} = 0,5 inkubiert. Anschließend wurden 10 mg Cycloheximid zugegeben und die Lösung für weitere 30 min inkubiert. Das Hefepellet wurde mit 10 ml Puffer A gewaschen und in N_{2liq} eingefroren und bei -20°C gelagert. Die Lyse der Zellen erfolgte manuell durch Zugabe von 1,5 ml Glasperlen (0,5 mm) und 0,6 ml Puffer A durch 4x 30 s Vortexen bei 4°C. Das so erhaltene Lysat wurde 10 min bei 14000 rpm 4°C zentrifugiert und ca. 200 bis 300 µl des Überstandes auf einen Gradienten aufgetragen. Die Auftrennung der Zellkomponenten erfolgte durch Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge (Rotor SW40, BECKMAN INSTRUMENTS GMBH, München, D) bei 27000 rpm für 16 h bei 4°C. Anschließend wurde das UV-Profil (λ = 254 nm) des Gradienten mit dem ProTeam LC Gradienten System (ISCO, Lincoln, Nebraska, USA) bestimmt und in 400 µl Einzel-Volumina fraktioniert.

Zur Sedimentationsanalyse von Proteinen wurden die einzelnen Fraktionen mit TCA (siehe Material & Methoden 2.2.2) gefällt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert.

Die eGFP-Fusionsproteine wurden mit einem kommerziell erhältlichen GFP-Antikörper der Firma ZYMED LABORATORIES (San Francisco, CA, USA) nachgewiesen.

2.2.2 TCA-Fällung von Proteinen

Zu den Proben wurde 100%ige TCA (Trichloressigsäure) bis zu einer Endkonzentration von 10% zugegeben. Nach Mischen und Inkubation der Proben für 10 min auf Eis wurde für 10 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet mit 1 ml 10%iger TCA gewaschen.

Die gefällten Proteine wurden in 60 μ l basischem Probenpuffer (1xSDS-Proben-Puffer + 75 mM Tris-HCl pH 9,4) resuspendiert. Nach Inkubation für 3 – 5 min bei 95°C wurden die Proben durch Westernblot analysiert.

2.2.3 RNA Isolierung aus Saccharose-Gradienten Fraktionen

RNA wurde, wie bei Maniatis *et al.* (1989) beschrieben, mit Phenol/Chloroform isoliert.

Für Northern Hybridisierungsexperimente wurden je 3 μ l der resuspendierten RNA einer jeden Fraktion auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen.

2.2.4 Sondenpräparation

DNA-Sonden wurden mit dem PRIME-IT[®] II Random Primer Labeling Kit der Firma STRATAGENE (La Jolla, CA, USA) nach Angaben des Herstellers präpariert.

2.2.5 Northern Hybridisierung

Northern Hybridisierung wurde nach Maniatis *et al.* (1989) durchgeführt.

Die Detektion der Signale auf der hybridisierten Membran geschah durch Autoradiographie mittels Röntgenfilm X-omat AR der Firma KODAK (Rochester, New York, USA).

3. Datenbanken und Sequenzanalyse-Programme

Sequenzdaten und andere Informationen über *S. cerevisiae* Gene sind aus folgenden Datenbanken entnommen:

YPD Datenbank <http://www.incyte.com/sequence/proteome/index.shtml>

SGD Datenbank <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>

Sequenzdaten höherer eukaryontischer Organismen sind aus folgender Datenbank:

EuGenes Datenbank <http://iubio.bio.indiana.edu:8089/>

Röntgenkristallographie-Strukturdaten zur Erstellung von dreidimensionalen Proteinstruktur-modellen wurden von folgender Datenbank erhalten:

Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb/>

Proteinstrukturen wurden mit dem folgenden Programm visualisiert:

RasMol RasMac Molecular Graphics Systems

Vergleiche von Proteinsequenzen wurden mit den aufgelisteten, im Internet erhältlichen Serviceprogrammen angefertigt:

Boxshade http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

NCBI Blast <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Clustal-W <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

λ	Wellenlänge
μ l	Mikroliter
5'-FOA	5'-Fluoruracil-6-carboxylsäure-monohydrat; 5'-Fluoro-orotic-acid; FOA
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
atm	Atmosphären (Einheit Druck)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BP	Bindendes Protein
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirca
cAMP	zyklisches AMP (3',5'-cyclo AMP)
CBC	Kappen-bindender Komplex (cap binding complex)
CCD	digitale Kamera
CEN	centromeres Segment
CSM	complete synthetic mix
cyt	zytoplasmatisch
d	Tage (days)
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
d.h.	das heisst
Dm	<i>D. melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ec	<i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF-1A	Eukaryontischer Translationselongationsfaktor 1A
eGFP	verstärkt grün-fluoreszierendes Protein (enhanced)
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-tetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
ETS	external transcribed spacer
FL	gesamte Länge des Proteins (full length)
FRYL	Fromont-Racine yeast library
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid Austausch Faktor (guanine nucleotide exchange factor)
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphatase
h	Stunde
<i>H. marismortui</i>	<i>Haloarcula marismortui</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>

HIV	humanes Immundefizienz-Virus
Hm	<i>H. marismortui</i>
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein-Partikel
Hs	<i>H. sapiens</i>
IBB-Domäne	Importin- β bindende Domäne
Imp	Importin
ITS	internal transcribed spacer
Kap	Karyopherin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCS	library cloning site
LMB	Leptomycin B
lq	liquid; flüssig
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>M. vanniellii</i>	<i>Methanococcus vanniellii</i>
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
Mm	<i>M. musculus</i>
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
mRNP	mRNA enthaltendes Ribonukleoprotein Partikel
MTR	mRNA Transport
Mv	<i>M. vanniellii</i>
n	nukleär
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
Nc	<i>N. crassa</i>
NEC	NES Complementation Candidate; Kandidat des funktionellen NES Assays
NES	nukleäres Exportsignal (nuclear export signal)
NESB	NES Assay Bibliothek
NESTP	NES-Test Plasmid
ng	Nanogramm
NLS	nukleäres Lokalisierungssignal (nuclear localisation signal)
nm	Nanometer
NPC	nukleärer Porenkomplex (nuclear pore complex)
NTF2	nukleärer Transportfaktor 2
NTP	Nukleotid-triphosphat
Nup	Nukleoporin / Kernporenprotein
OD _{546/260nm}	Absorption bei 546 oder 260 nm
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	pH-Wert
P _i	Phosphation
PKA	Protein Kinase A

PKI	Protein Kinase Inhibitor
Ran	Ras-verwandtes nukleäres Protein (Ras-related nuclear protein)
RBD	Ran-Bindungsdomäne
rDNA	ribosomale DNA
RIX	Ribosomale Exportmutante / <u>R</u> ibosomen <u>E</u> xport
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNP	Ribonukleoprotein Partikel
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. solfataricus</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
Sc	<i>S. cerevisiae</i>
SDC	synthetisches Glukose-Komplettmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGC	synthetisches Galaktose-Komplettmedium
“Shuffle” Stamm	Disruptionsstamm komplementiert mit einem pURA3-WT Plasmid
SL	synthetisch letal / synthetische Letalität
snoRNA	kleine nukleoläre RNA (small nucleolar RNA)
snRNA	kleine nukleäre Ribonukleinsäure
Sp	<i>S. pombe</i>
Ss	<i>S. solfataricus</i>
Stp	<i>S. pyogenes</i>
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
ts	temperatursensitiv
ü/N	über Nacht
UsnRNA	Uridin-reiche kleine nukleäre RNA “uridine-rich small nuclear RNA”
UsnRNP	Uridin-reicher kleiner nukleärer RNP “uridine-rich small nuclear RNP”
wt	Wildtyp
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Xl	<i>X. laevis</i>
YPD	Glukose-haltiges Vollmedium für Hefe
YPG	Galaktose-haltiges Vollmedium für Hefe
z.B.	zum Beispiel

Termini technici

Häufig in Laborjargon verwendete Fachausdrücke wie Screen, Assay, Repeats, Inkubation, Vortexen etc. wurden nicht übersetzt in dieser Arbeit benutzt.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi, Y. & Yanagida, M. (1989).** Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1+* which encodes a 115- kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *J Cell Biol* **108**, 1195-207.
- Adam, S. A. (1999).** Transport pathways of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 402-6.
- Aitchison, J. D., Blobel, G. & Rout, M. P. (1996).** Kap104p: a karyopherin involved in the nuclear transport of messenger RNA binding proteins. *Science* **274**, 624-7.
- Allen, N. P., Huang, L., Burlingame, A. & Rexach, M. (2001).** Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. *J Biol Chem* **276**, 29268-74.
- Allen, T. D., Cronshaw, J. M., Bagley, S., Kiseleva, E. & Goldberg, M. W. (2000).** The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* **113**, 1651-9.
- Allison, L. A., North, M. T. & Neville, L. A. (1995).** Differential binding of oocyte-type and somatic-type 5S rRNA to TFIIA and ribosomal protein L5 in *Xenopus* oocytes: specialization for storage versus mobilization. *Dev Biol* **168**, 284-95.
- Allison, L. A., Romaniuk, P. J. & Bakken, A. H. (1991).** RNA-protein interactions of stored 5S RNA with TFIIA and ribosomal protein L5 during *Xenopus* oogenesis. *Dev Biol* **144**, 129-44.
- Amberg, D. C., Goldstein, A. L. & Cole, C. N. (1992).** Isolation and characterization of *RAT1*: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev* **6**, 1173-89.
- Arts, G. J., Fornerod, M. & Mattaj, I. W. (1998a).** Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr Biol* **8**, 305-14.
- Arts, G. J., Kuersten, S., Romby, P., Ehresmann, B. & Mattaj, I. W. (1998b).** The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *Embo J* **17**, 7430-41.
- Azuma, Y. & Dasso, M. (2000).** The role of Ran in nuclear function. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 302-7.
- Bachi, A., Braun, I. C., Rodrigues, J. P., Pante, N., Ribbeck, K., von Kobbe, C., Kutay, U., Wilm, M., Gorlich, D., Carmo-Fonseca, M. & Izaurralde, E. (2000).** The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *Rna* **6**, 136-58.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000).** The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-20.
- Baßler, J. (2001b).** Isolierung eines nukleären 60S Prä-Ribosoms, das ein Exportintermediat ins Zytoplasma darstellt. **Inaugural-Dissertation**, Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Baßler, J., Grandi, P., Gadal, O., Lessmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J. & Hurt, E. (2001a).** Identification of a 60S Preribosomal Particle that Is Closely Linked to Nuclear Export. *Mol Cell* **8**, 517-29.

- Bataille, N., Helser, T. & Fried, H. M. (1990).** Cytoplasmic transport of ribosomal subunits microinjected into the *Xenopus laevis* oocyte nucleus: a generalized, facilitated process. *J Cell Biol* **111**, 1571-82.
- Bayliss, R., Littlewood, T. & Stewart, M. (2000).** Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell* **102**, 99-108.
- Bayliss, R., Ribbeck, K., Akin, D., Kent, H. M., Feldherr, C. M., Gorlich, D. & Stewart, M. (1999).** Interaction between NTF2 and xFxFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP. *J Mol Biol* **293**, 579-93.
- Belhumeur, P., Lee, A., Tam, R., DiPaolo, T., Fortin, N. & Clark, M. W. (1993).** *GSP1* and *GSP2*, genetic suppressors of the *prp20-1* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP-binding proteins involved in the maintenance of nuclear organization. *Mol Cell Biol* **13**, 2152-61.
- Ben-Efraim, I. & Gerace, L. (2001).** Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import. *J Cell Biol* **152**, 411-7.
- Bischoff, F. R. & Ponstingl, H. (1991).** Mitotic regulator protein *RCC1* is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10830-4.
- Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J. & Cullen, B. R. (1996).** Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol* **16**, 4207-14.
- Bohnsack, M. T., Regener, K., Schwappach, B., Saffrich, R., Paraskeva, E., Hartmann, E. & Görlich, D. (2002).** Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. *Embo J* **21**, 6205-15.
- Braunwarth, A., Fromont-Racine, M., Legrain, P., Bischoff, R., Hurt, E. & Künzler, M. (2002).** Identification and characterization of a novel yeast RanGTP-binding protein that shuttles between nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem* zur Publikation eingereicht.
- Calado, A., Treichel, N., Muller, E. C., Otto, A. & Kutay, U. (2002).** Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA. *Embo J* **21**, 6216-6224.
- Calvo, O., Cuesta, R., Anderson, J., Gutierrez, N., Garcia-Barrio, M. T., Hinnebusch, A. G. & Tamame, M. (1999).** GCD14p, a repressor of *GCN4* translation, cooperates with Gcd10p and Lhp1p in the maturation of initiator methionyl-tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 4167-81.
- Chang, J. S., Henry, K., Wolf, B. L., Geli, M. & Lemmon, S. K. (2002).** Protein Phosphatase-1 binding to Scd5p is important for regulation of actin organization and endocytosis in Yeast. *J Biol Chem* **277**, 27.
- Clarkson, W. D., Kent, H. M. & Stewart, M. (1996).** Separate binding sites on nuclear transport factor 2 (NTF2) for GDP-Ran and the phenylalanine-rich repeat regions of nucleoporins p62 and Nsp1p. *J Mol Biol* **263**, 517-24.
- Claußen, M., Rudt, F. & Pieler, T. (1999).** Functional Modules in Ribosomal Protein L5 for Ribonucleoprotein Complex Formation and Nucleocytoplasmic Transport. *J Biol Chem* **274**, 33951-33958.
- Clouse, K. N., Luo, M. J., Zhou, Z. & Reed, R. (2001).** A Ran-independent pathway for export of spliced mRNA. *Nat Cell Biol* **3**, 97-9.

- Conti, E. & Izaurralde, E. (2001).** Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 310-9.
- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T. & Matunis, M. J. (2002).** Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* **158**, 915-27.
- Dasso, M. (2001).** Running on Ran: nuclear transport and the mitotic spindle. *Cell* **104**, 321-4.
- Denning, D., Mykytka, B., Allen, N. P., Huang, L., Al, B. & Rexach, M. (2001).** The nucleoporin Nup60p functions as a Gsp1p-GTP-sensitive tether for Nup2p at the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **154**, 937-50.
- Deshmukh, M., Stark, J., Yeh, L. C., Lee, J. C. & Woolford, J. L., Jr. (1995).** Multiple regions of yeast ribosomal protein L1 are important for its interaction with 5 S rRNA and assembly into ribosomes. *J Biol Chem* **270**, 30148-56.
- Deshmukh, M., Tsay, Y. F., Paulovich, A. G. & Woolford, J. L., Jr. (1993).** Yeast ribosomal protein L1 is required for the stability of newly synthesized 5S rRNA and the assembly of 60S ribosomal subunits. *Mol Cell Biol* **13**, 2835-45.
- Dilworth, D. J., Suprpto, A., Padovan, J. C., Chait, B. T., Wozniak, R. W., Rout, M. P. & Aitchison, J. D. (2001).** Nup2p dynamically associates with the distal regions of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* **153**, 1465-78.
- Doye, V. & Hurt, E. (1997).** From nucleoporins to nuclear pore complexes. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 401-11.
- Doye, V., Wepf, R. & Hurt, E. C. (1994).** A novel nuclear pore protein Nup133p with distinct roles in poly(A)⁺ RNA transport and nuclear pore distribution. *Embo J* **13**, 6062-75.
- Enenkel, C., Lehmann, A. & Kloetzel, P. M. (1998).** Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *Embo J* **17**, 6144-54.
- Englmeier, L., Olivo, J. C. & Mattaj, I. W. (1999).** Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr Biol* **9**, 30-41.
- Fahrenkrog, B., Stoffler, D. & Aebi, U. (2001).** Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* **259**, 95-117.
- Fatica, A. & Tollervey, D. (2002).** Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 313-8.
- Feldherr, C. M. & Akin, D. (1990).** The permeability of the nuclear envelope in dividing and nondividing cell cultures. *J Cell Biol* **111**, 1-8.
- Feng, W. & Hopper, A. K. (2002).** A Los1p-independent pathway for nuclear export of intronless tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5412-7.
- Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T. & Johnston, S. A. (2001).** The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* **7**, 981-91.
- Fischer, U., Darzynkiewicz, E., Tahara, S. M., Dathan, N. A., Luhrmann, R. & Mattaj, I. W. (1991).** Diversity in the signals required for nuclear accumulation of U snRNPs and variety in the pathways of nuclear transport. *J Cell Biol* **113**, 705-14.

- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W. & Luhrmann, R. (1995).** The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**, 475-83.
- Fischer, U., Liu, Q. & Dreyfuss, G. (1997).** The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* **90**, 1023-9.
- Fischer, U. & Lührmann, R. (1990).** An essential signaling role for the m3G cap in the transport of U1 snRNP to the nucleus. *Science* **249**, 786-90.
- Fischer, U., Sumpter, V., Sekine, M., Satoh, T. & Luhrmann, R. (1993).** Nucleo-cytoplasmic transport of U snRNPs: definition of a nuclear location signal in the Sm core domain that binds a transport receptor independently of the m3G cap. *Embo J* **12**, 573-83.
- Fontoura, B. M., Blobel, G. & Matunis, M. J. (1999).** A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96. *J Cell Biol* **144**, 1097-112.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. & Mattaj, I. W. (1997).** CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051-60.
- Fribourg, S., Braun, I. C., Izaurralde, E. & Conti, E. (2001).** Structural Basis for the Recognition of a Nucleoporin FG Repeat by the NTF2-like Domain of the TAP/p15 mRNA Nuclear Export Factor. *Mol Cell* **8**, 645-56.
- Fridell, R. A., Truant, R., Thorne, L., Benson, R. E. & Cullen, B. R. (1997).** Nuclear import of hnRNP A1 is mediated by a novel cellular cofactor related to karyopherin-beta. *J Cell Sci* **110**, 1325-31.
- Fritz, C. C., Zapp, M. L. & Green, M. R. (1995).** A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature* **376**, 530-3.
- Fromont-Racine, M., Rain, J. C. & Legrain, P. (1997).** Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* **16**, 277-82.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. & Nishida, E. (1997).** CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390**, 308-11.
- Gadal, O., Strauß, D., Braspenning, J., Hoepfner, D., Petfalski, E., Philippsen, P., Tollervey, D. & Hurt, E. (2001b).** A nuclear AAA-type ATPase (Rix7p) is required for biogenesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits. *Embo J* **20**, 3695-704.
- Gadal, O., Strauß, D., Kessl, J., Trumpower, B., Tollervey, D. & Hurt, E. (2001a).** Nuclear export of 60S ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* **21**, 3405-15.
- Gadal, O., Strauß, D., Petfalski, E., Gleizes, P. E., Gas, N., Tollervey, D. & Hurt, E. (2002).** Rlp7p is associated with 60S preribosomes, restricted to the granular component of the nucleolus, and required for pre-rRNA processing. *J Cell Biol* **157**, 941-51.
- Gatfield, D., Le Hir, H., Schmitt, C., Braun, I. C., Kocher, T., Wilm, M. & Izaurralde, E. (2001).** The DEXH/D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. *Curr Biol* **11**, 1716-21.

- Gavin, A. C., et al. & Superti-Furga, G. (2002).** Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-7.
- Giebel, L. B. & Spritz, R. A. (1990).** Site-directed mutagenesis using a double-stranded DNA fragment as a PCR primer. *Nucl. Acids Res.* **18**, 4947.
- Gleizes, P. E., Noaillac-Depeyre, J., Leger-Silvestre, I., Teulieres, F., Dauxois, J. Y., Pommet, D., Azum-Gelade, M. C. & Gas, N. (2001).** Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. *J Cell Biol* **155**, 923-36.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fried, V. A. & Finley, D. (1998).** The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* **18**, 3149-62.
- Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F. R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S. & Izaurralde, E. (1997).** A novel class of RanGTP binding proteins. *J Cell Biol* **138**, 65-80.
- Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A. & Hartmann, E. (1996a).** A 41 amino acid motif in importin- α confers binding to importin- β and hence transit into the nucleus. *Embo J* **15**, 1810-7.
- Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R. A., Hartmann, E. & Prehn, S. (1995).** Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol* **5**, 383-92.
- Görlich, D. & Kutay, U. (1999).** Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 607-60.
- Görlich, D. & Mattaj, I. W. (1996b).** Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271**, 1513-8.
- Grandi, P., Rybin, V., Baßler, J., Petfalski, E., Strauß, D., Marzioch, M., Schäfer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., Gavin, A. C. & Hurt, E. (2002).** 90S Pre-Ribosomes Include the 35S Pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S Subunit Processing Factors but Predominantly Lack 60S Synthesis Factors. *Mol Cell* **10**, 105-15.
- Greenberg, J. R., Phan, L., Gu, Z., deSilva, A., Apolito, C., Sherman, F., Hinnebusch, A. G. & Goldfarb, D. S. (1998).** Nip1p associates with 40 S ribosomes and the Prt1p subunit of eukaryotic initiation factor 3 and is required for efficient translation initiation. *J Biol Chem* **273**, 23485-94.
- Großhans, H., Deinert, K., Hurt, E. & Simos, G. (2001).** Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p- mediated export. *J Cell Biol* **153**, 745-62.
- Großhans, H., Hurt, E. & Simos, G. (2000a).** An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes Dev* **14**, 830-40.
- Großhans, H., Simos, G. & Hurt, E. (2000b).** Transport of tRNA out of the nucleus-direct channeling to the ribosome? *J Struct Biol* **129**, 288-94.
- Grüter, P., Tabernero, C., von Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B. K. & Izaurralde, E. (1998).** TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell* **1**, 649-59.
- Gu, Z., Moerschell, R. P., Sherman, F. & Goldfarb, D. S. (1992).** *NIP1*, a gene required for nuclear transport in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10355-9.

- Guddat, U., Bakken, A. H. & Pieler, T. (1990).** Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in xenopus oocytes. *Cell* **60**, 619-28.
- Gulyas, K. D. & Donahue, T. F. (1992).** SSL2, a suppressor of a stem-loop mutation in the HIS4 leader encodes the yeast homolog of human ERCC-3. *Cell* **69**, 1031-42.
- Hamamoto, T., Gunji, S., Tsuji, H. & Beppu, T. (1983a).** Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. I. Taxonomy of the producing strain and their fermentation, purification and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **36**, 639-45.
- Hamamoto, T., Seto, H. & Beppu, T. (1983b).** Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. II. Structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* **36**, 646-50.
- Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & Woolford, J. L. (2001).** Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol Cell* **8**, 505-15.
- Hellmuth, K., Lau, D. M., Bischoff, F. R., Künzler, M., Hurt, E. & Simos, G. (1998).** Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol Cell Biol* **18**, 6374-86.
- Henry, K. R., D'Hondt, K., Suk Chang, J., Newpher, T., Huang, K., Hudson, R. T., Riezman, H. & Lemmon, S. K. (2002).** Scd5p and clathrin function are important for cortical actin organization, endocytosis and localization of Sla2p in yeast. *Mol Biol Cell* **13**, 2607-25.
- Herold, A., Truant, R., Wiegand, H. & Cullen, B. R. (1998).** Determination of the functional domain organization of the importin alpha nuclear import factor. *J Cell Biol* **143**, 309-18.
- Ho, J. H., Kallstrom, G. & Johnson, A. W. (2000).** Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol* **151**, 1057-66.
- Ho, Y., et al. & Tyers, M. (2002).** Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180-3.
- Hood, J. K. & Silver, P. A. (1998).** Cse1p is required for export of Srp1p/importin-alpha from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 35142-6.
- Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M. & Luhrmann, R. (1998).** Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *Embo J* **17**, 4114-26.
- Hurt, E., Hannus, S., Schmelzl, B., Lau, D., Tollervey, D. & Simos, G. (1999).** A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants. *J Cell Biol* **144**, 389-401.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. & Sakaki, Y. (2001).** A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4569-74.
- Itoh, H., Fukada, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983).** Transformation of intact cells with alkali cations. *J.Bacteriol.* **153**, 163-168.
- Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I. W. & Görlich, D. (1997).** The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J* **16**, 6535-47.

- Izaurrealde, E., Lewis, J., Gamberi, C., Jarmolowski, A., McGuigan, C. & Mattaj, I. W. (1995).** A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* **376**, 709-12.
- Jackson, C. L. & Kepes, F. (1994).** *BFR1*, a multicopy suppressor of brefeldin A-induced lethality, is implicated in secretion and nuclear segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **137**, 423-37.
- Jackson, R. J., Hunt, S. L., Gibbs, C. L. & Kaminski, A. (1994).** Internal initiation of translation of picornavirus RNAs. *Mol Biol Rep* **19**, 147-59.
- Jarmolowski, A., Boelens, W. C., Izaurrealde, E. & Mattaj, I. W. (1994).** Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J Cell Biol* **124**, 627-35.
- Kadowaki, T., Chen, S., Hitomi, M., Jacobs, E., Kumagai, C., Liang, S., Schneider, R., Singleton, D., Wisniewska, J. & Tartakoff, A. M. (1994a).** Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mRNA transport-defective (mtr) mutants. *J Cell Biol* **126**, 649-59.
- Kadowaki, T., Hitomi, M., Chen, S. & Tartakoff, A. M. (1994b).** Nuclear mRNA accumulation causes nucleolar fragmentation in yeast *mtr2* mutant. *Mol Biol Cell* **5**, 1253-63.
- Kadowaki, T., Zhao, Y. & Tartakoff, A. M. (1992).** A conditional yeast mutant deficient in mRNA transport from nucleus to cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2312-6.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. & Smith, A. E. (1984).** A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499-509.
- Katahira, J., Sträßer, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., Jung, J. U. & Hurt, E. (1999).** The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *Embo J* **18**, 2593-609.
- Khanna-Gupta, A. & Ware, V. C. (1989).** Nucleocytoplasmic transport of ribosomes in a eukaryotic system: is there a facilitated transport process? *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1791-5.
- Köhler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F. R., Prehn, S., Haller, H., Görlich, D. & Hartmann, E. (1999).** Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol Cell Biol* **19**, 7782-91.
- Komeili, A. & O'Shea, E. K. (2001).** New perspectives on nuclear transport. *Annu Rev Genet* **35**, 341-64.
- Kose, S., Imamoto, N., Tachibana, T., Shimamoto, T. & Yoneda, Y. (1997).** Ran-unassisted nuclear migration of a 97-kD component of nuclear pore- targeting complex. *J Cell Biol* **139**, 841-9.
- Kressler, D., Linder, P. & de La Cruz, J. (1999).** Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 7897-912.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M. & Horinouchi, S. (1999).** Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9112-7.
- Kuersten, S., Ohno, M. & Mattaj, I. W. (2001).** Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol* **11**, 497-503.

- Künzler, M., Gerstberger, T., Stutz, F., Bischoff, F. R. & Hurt, E. (2000).** Yeast Ran-binding protein 1 (Yrb1) shuttles between the nucleus and cytoplasm and is exported from the nucleus via a *CRM1 (XPO1)*-dependent pathway. *Mol Cell Biol* **20**, 4295-308.
- Künzler, M. & Hurt, E. (2001b).** Targeting of Ran: variation on a common theme? *J Cell Sci* **114**, 3233-41.
- Künzler, M. & Hurt, E. C. (1998).** Cse1p functions as the nuclear export receptor for importin alpha in yeast. *FEBS Lett* **433**, 185-90.
- Künzler, M., Trueheart, J., Sette, C., Hurt, E. & Thorner, J. (2001a).** Mutations in the *YRB1* gene encoding yeast ran-binding-protein-1 that impair nucleocytoplasmic transport and suppress yeast mating defects. *Genetics* **157**, 1089-105.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R. & Görlich, D. (1997).** Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90**, 1061-71.
- Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Schwarzmaier, P., Hartmann, E. & Görlich, D. (1998).** Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol Cell* **1**, 359-69.
- Lafontaine, D. L. & Tollervey, D. (2001).** The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 514-20.
- Lang, B. D., Li, A., Black-Brewster, H. D. & Fridovich-Keil, J. L. (2001).** The brefeldin A resistance protein Bfr1p is a component of polyribosome-associated mRNP complexes in yeast. *Nucleic Acids Res* **29**, 2567-74.
- Lau, D., Künzler, M., Braunwarth, A., Hellmuth, K., Podtelejnikov, A., Mann, M. & Hurt, E. (2000).** Purification of protein A-tagged yeast ran reveals association with a novel karyopherin beta family member, Pdr6p. *J Biol Chem* **275**, 467-71.
- Lee, D. C. & Aitchison, J. D. (1999).** Kap104p-mediated nuclear import. Nuclear localization signals in mRNA-binding proteins and the role of Ran and Rna. *J Biol Chem* **274**, 29031-7.
- Lee, M. S., Henry, M. & Silver, P. A. (1996).** A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes Dev* **10**, 1233-46.
- Lei, E. P., Krebber, H. & Silver, P. A. (2001).** Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes Dev* **15**, 1771-82.
- Lipowsky, G., Bischoff, F. R., Izaurralde, E., Kutay, U., Schafer, S., Gross, H. J., Beier, H. & Görlich, D. (1999).** Coordination of tRNA nuclear export with processing of tRNA. *Rna* **5**, 539-49.
- Lührmann, R., Kastner, B. & Bach, M. (1990).** Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. *Biochim Biophys Acta* **1087**, 265-92.
- Luo, M. L., Zhou, Z., Magni, K., Christoforides, C., Rappsilber, J., Mann, M. & Reed, R. (2001).** Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. *Nature* **413**, 644-7.
- Lygerou, Z., Christophides, G. & Seraphin, B. (1999).** A novel genetic screen for snRNP assembly factors in yeast identifies a conserved protein, Sad1p, also required for pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* **19**, 2008-20.
- Maniatis, T., Fritsch, E. T. & Sambrook, J. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York.

- Mattaj, I. W. (1998a).** Ribonucleoprotein assembly: clues from spinal muscular atrophy. *Curr Biol* **8**, R93-5.
- Mattaj, I. W. & Englmeier, L. (1998b).** Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* **67**, 265-306.
- Michael, W. M., Choi, M. & Dreyfuss, G. (1995).** A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature- dependent nuclear protein export pathway. *Cell* **83**, 415-22.
- Milkereit, P., Gadai, O., Podtelejnikov, A., Trumtel, S., Gas, N., Petfalski, E., Tollervey, D., Mann, M., Hurt, E. & Tschochner, H. (2001).** Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell* **105**, 499-509.
- Milkereit, P., Strauß, D., Baßler, J., Gadai, O., Kühn, H., Schütz, S., Gas, N., Lechner, J., Hurt, E. & Tschochner, H. (2002).** A Noc-complex specifically involved in the formation and nuclear export of ribosomal 40S subunits. *J Biol Chem* **20**, 20.
- Mingot, J. M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E. & Görlich, D. (2001).** Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *Embo J* **20**, 3685-94.
- Moore, M. S. & Blobel, G. (1993).** The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365**, 661-3.
- Moreland, R. B., Nam, H. G., Hereford, L. M. & Fried, H. M. (1985).** Identification of a nuclear localization signal of a yeast ribosomal protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6561-5.
- Moy, T. I. & Silver, P. A. (1999).** Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev* **13**, 2118-33.
- Moy, T. I. & Silver, P. A. (2002).** Requirements for the nuclear export of the small ribosomal subunit. *J Cell Sci* **115**, 2985-95.
- Murdoch, K. J. & Allison, L. A. (1996).** A role for ribosomal protein L5 in the nuclear import of 5S rRNA in *Xenopus* oocytes. *Exp Cell Res* **227**, 332-43.
- Nachury, M. V., Ryder, U. W., Lamond, A. I. & Weis, K. (1998).** Cloning and characterization of hSRP1 gamma, a tissue-specific nuclear transport factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 582-7.
- Nachury, M. V. & Weis, K. (1999).** The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9622-7.
- Nadler, S. G., Tritschler, D., Haffar, O. K., Blake, J., Bruce, A. G. & Cleaveland, J. S. (1997).** Differential expression and sequence-specific interaction of karyopherin alpha with nuclear localization sequences. *J Biol Chem* **272**, 4310-5.
- Nakielnny, S. & Dreyfuss, G. (1996).** The hnRNP C proteins contain a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals. *J Cell Biol* **134**, 1365-73.
- Nakielnny, S. & Dreyfuss, G. (1998).** Import and export of the nuclear protein import receptor transportin by a mechanism independent of GTP hydrolysis. *Curr Biol* **8**, 89-95.
- Nazar, R. N. (1979).** The ribosomal protein binding site in *S. cerevisiae* ribosomal 5S RNA. A conserved protein binding site in 5S RNA. *J Biol Chem* **254**, 7724-7729.

- Nehrbass, U., Fabre, E., Dihlmann, S., Herth, W. & Hurt, E. C. (1993).** Analysis of nucleocytoplasmic transport in a thermosensitive mutant of nuclear pore protein *NSP1*. *Eur J Cell Biol* **62**, 1-12.
- Nelson, K. K., Holmer, M. & Lemmon, S. K. (1996).** *SCD5*, a suppressor of clathrin deficiency, encodes a novel protein with a late secretory function in yeast. *Mol Biol Cell* **7**, 245-60.
- Neville, M. & Rosbash, M. (1999).** The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **18**, 3746-56.
- Nigg, E. A. (1997).** Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* **386**, 779-87.
- Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S. & Beppu, T. (1994).** Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J Biol Chem* **269**, 6320-4.
- Nissan, T. A., Baßler, J., Petfalski, E., Tollervey, D. & Hurt, E. (2002).** 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *Embo J* **21**, 5539-47.
- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M. & Mattaj, I. W. (2000).** PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* **101**, 187-98.
- Ossareh-Nazari, B., Maison, C., Black, B. E., Levesque, L., Paschal, B. M. & Dargemont, C. (2000).** RanGTP-binding protein NXT1 facilitates nuclear export of different classes of RNA in vitro. *Mol Cell Biol* **20**, 4562-71.
- Palacios, I., Hetzer, M., Adam, S. A. & Mattaj, I. W. (1997).** Nuclear import of U snRNPs requires importin beta. *Embo J* **16**, 6783-92.
- Panse, V. G., Küster, B., Gerstberger, T. & Hurt, E. (2002).** Unconventional tethering of SUMO-1 deconjugating enzyme Ulp1 to the transport channel of the nuclear pore complex via karyopherins. *Nat Cell Biol* **16**, 16.
- Pante, N. & Kann, M. (2002).** Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* **13**, 425-34.
- Paraskeva, E., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Huber, J., Kutay, U., Hartmann, E., Luhrmann, R. & Görlich, D. (1999).** CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol* **145**, 255-64.
- Pemberton, L. F., Rosenblum, J. S. & Blobel, G. (1997).** A distinct and parallel pathway for the nuclear import of an mRNA-binding protein. *J Cell Biol* **139**, 1645-53.
- Pemberton, L. F., Rosenblum, J. S. & Blobel, G. (1999).** Nuclear import of the TATA-binding protein: mediation by the karyopherin Kap114p and a possible mechanism for intranuclear targeting. *J Cell Biol* **145**, 1407-17.
- Phan, L., Schoenfeld, L. W., Valasek, L., Nielsen, K. H. & Hinnebusch, A. G. (2001).** A subcomplex of three eIF3 subunits binds eIF1 and eIF5 and stimulates ribosome binding of mRNA and tRNA(i)Met. *Embo J* **20**, 2954-65.
- Pokrywka, N. J. & Goldfarb, D. S. (1995).** Nuclear export pathways of tRNA and 40 S ribosomes include both common and specific intermediates. *J Biol Chem* **270**, 3619-24.

- Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielnny, S., Siomi, M. C., Wang, F. & Dreyfuss, G. (1996).** A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86**, 985-94.
- Prieve, M. G., Guttridge, K. L., Munguia, J. E. & Waterman, M. L. (1996).** The nuclear localization signal of lymphoid enhancer factor-1 is recognized by two differentially expressed Srp1-nuclear localization sequence receptor proteins. *J Biol Chem* **271**, 7654-8.
- Quaye, I. K., Toku, S. & Tanaka, T. (1996).** Sequence requirement for nucleolar localization of rat ribosomal protein L31. *Eur J Cell Biol* **69**, 151-5.
- Reed, R. & Hurt, E. (2002).** A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* **108**, 523-31.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E. L., Jr., Jarnik, M., Engel, A. & Aebersold, U. (1990).** Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* **110**, 883-94.
- Ribbeck, K. & Görlich, D. (2001).** Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *Embo J* **20**, 1320-30.
- Ribbeck, K. & Görlich, D. (2002).** The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *Embo J* **21**, 2664-71.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M. & Görlich, D. (1998).** NTF2 mediates nuclear import of Ran. *Embo J* **17**, 6587-98.
- Rinaldi, T., Ricci, C., Porro, D., Bolotin-Fukuhara, M. & Frontali, L. (1998).** A mutation in a novel yeast proteasomal gene, RPN11/MPR1, produces a cell cycle arrest, overreplication of nuclear and mitochondrial DNA, and an altered mitochondrial morphology. *Mol Biol Cell* **9**, 2917-31.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. & Dingwall, C. (1991).** Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**, 615-23.
- Robzyk, K. & Kassir, Y. (1992).** A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* **20**, 3790.
- Rosenblum, J. S., Pemberton, L. F. & Blobel, G. (1997).** A nuclear import pathway for a protein involved in tRNA maturation. *J Cell Biol* **139**, 1655-61.
- Rosorius, O., Fries, B., Stauber, R. H., Hirschmann, N., Bevec, D. & Hauber, J. (2000).** Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals. *J Biol Chem* **275**, 12061-12068.
- Rout, M. P. & Aitchison, J. D. (2001).** The nuclear pore complex as a transport machine. *J Biol Chem* **276**, 16593-6.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Supranto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. & Chait, B. T. (2000).** The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* **148**, 635-51.
- Rout, M. P. & Blobel, G. (1993).** Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* **123**, 771-83.
- Rout, M. P., Blobel, G. & Aitchison, J. D. (1997).** A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* **89**, 715-25.

- Rudt, F. & Pieler, T. (1996).** Cytoplasmic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs. *Embo J* **15**, 1383-91.
- Russo, G., Ricciardelli, G. & Pietropaolo, C. (1997).** Different domains cooperate to target the human ribosomal L7a protein to the nucleus and to the nucleoli. *J Biol Chem* **272**, 5229-35.
- Ryan, K. J. & Wente, S. R. (2000).** The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 361-71.
- Santos-Rosa, H., Moreno, H., Simos, G., Segref, A., Fahrenkrog, B., Pante, N. & Hurt, E. (1998).** Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol Cell Biol* **18**, 6826-38.
- Sarkar, S. & Hopper, A. K. (1998).** tRNA nuclear export in *Saccharomyces cerevisiae*: in situ hybridization analysis. *Mol Biol Cell* **9**, 3041-55.
- Saveanu, C., Bienvenu, D., Namane, A., Gleizes, P. E., Gas, N., Jacquier, A. & Fromont-Racine, M. (2001).** Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *Embo J* **20**, 6475-6484.
- Schaap, P. J., van't Riet, J., Woldringh, C. L. & Raue, H. A. (1991).** Identification and functional analysis of the nuclear localization signals of ribosomal protein L25 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **221**, 225-37.
- Schlenstedt, G., Smirnova, E., Deane, R., Solsbacher, J., Kutay, U., Gorlich, D., Ponstingl, H. & Bischoff, F. R. (1997).** Yrb4p, a yeast ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus. *Embo J* **16**, 6237-49.
- Schmidt, C., Lipsius, E. & Kruppa, J. (1995).** Nuclear and nucleolar targeting of human ribosomal protein S6. *Mol Biol Cell* **6**, 1875-85.
- Schröder, A. J., Chen, X. H., Xiao, Z. & Fitzgerald-Hayes, M. (1999).** Genetic evidence for interactions between yeast importin alpha (Srp1p) and its nuclear export receptor, Cse1p. *Mol Gen Genet* **261**, 788-95.
- Schwoebel, E. D., Talcott, B., Cushman, I. & Moore, M. S. (1998).** Ran-dependent signal-mediated nuclear import does not require GTP hydrolysis by Ran. *J Biol Chem* **273**, 35170-5.
- Seedorf, M. & Silver, P. A. (1997).** Importin/karyopherin protein family members required for mRNA export from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8590-5.
- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Luhrmann, R. & Hurt, E. (1997).** Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores. *Embo J* **16**, 3256-71.
- Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T. & Yoneda, Y. (1997).** Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *Embo J* **16**, 7067-77.
- Senger, B., Simos, G., Bischoff, F. R., Podtelejnikov, A., Mann, M. & Hurt, E. (1998).** Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *Embo J* **17**, 2196-207.
- Sherman, F. (1991).** Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **194**, 3-21.
- Shiina, N., Gotoh, Y., Kubomura, N., Iwamatsu, A. & Nishida, E. (1994).** Microtubule severing by elongation factor 1 alpha. *Science* **266**, 282-5.

- Sikorski, R. S. & Hieter, P. (1989).** A system of shuffle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *S. cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Simos, G., Tekotte, H., Grosjean, H., Segref, A., Sharma, K., Tollervey, D. & Hurt, E. C. (1996).** Nuclear pore proteins are involved in the biogenesis of functional tRNA. *Embo J* **15**, 2270-84. abs.html.
- Singleton, D. R., Chen, S., Hitomi, M., Kumagai, C. & Tartakoff, A. M. (1995).** A yeast protein that bidirectionally affects nucleocytoplasmic transport. *J Cell Sci* **108**, 265-72.
- Siomi, H. & Dreyfuss, G. (1995).** A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol* **129**, 551-60.
- Smith, A., Brownawell, A. & Macara, I. G. (1998).** Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr Biol* **8**, 1403-6.
- Solsbacher, J., Maurer, P., Bischoff, F. R. & Schlenstedt, G. (1998).** Cse1p is involved in export of yeast importin alpha from the nucleus. *Mol Cell Biol* **18**, 6805-15.
- Spahn, C. M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G. & Frank, J. (2001).** Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **107**, 373-86.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. & Weis, K. (1997).** Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**, 1041-50.
- Stage-Zimmermann, T., Schmidt, U. & Silver, P. A. (2000).** Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit in vivo. *Mol Biol Cell* **11**, 3777-89.
- Stauber, R. H. (2001).** Methods and assays to investigate nuclear export. *Curr Top Microbiol Immunol* **259**, 119-28.
- Stewart, M., Baker, R. P., Bayliss, R., Clayton, L., Grant, R. P., Littlewood, T. & Matsuura, Y. (2001).** Molecular mechanism of translocation through nuclear pore complexes during nuclear protein import. *FEBS Lett* **498**, 145-9.
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B. & Aebi, U. (1999).** The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 391-401.
- Sträßer, K., Baßler, J. & Hurt, E. (2000b).** Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J Cell Biol* **150**, 695-706.
- Sträßer, K. & Hurt, E. (2000a).** Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *Embo J* **19**, 410-20.
- Sträßer, K. & Hurt, E. (2001).** Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* **413**, 648-52.
- Sträßer, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A. G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R. & Hurt, E. (2002).** TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* **417**, 304-8.
- Stutz, F., Bachi, A., Doerks, T., Braun, I. C., Seraphin, B., Wilm, M., Bork, P. & Izaurralde, E. (2000).** REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *Rna* **6**, 638-50.

- Stutz, F., Neville, M. & Rosbash, M. (1995).** Identification of a novel nuclear pore-associated protein as a functional target of the HIV-1 Rev protein in yeast. *Cell* **82**, 495-506.
- Talcott, B. & Moore, M. S. (1999).** Getting across the nuclear pore complex. *Trends Cell Biol* **9**, 312-318.
- Taura, T., Krebber, H. & Silver, P. A. (1998).** A member of the Ran-binding protein family, Yrb2p, is involved in nuclear protein export. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7427-32.
- Underwood, M. R. & Fried, H. M. (1990).** Characterization of nuclear localizing sequences derived from yeast ribosomal protein L29. *Embo J* **9**, 91-9.
- Valasek, L., Nielsen, K. H. & Hinnebusch, A. G. (2002).** Direct eIF2-eIF3 contact in the multifactor complex is important for translation initiation in vivo. *Embo J* **21**, 5886-98.
- Vasu, S. K. & Forbes, D. J. (2001).** Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 363-75.
- Venema, J. & Tollervey, D. (1999).** Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* **33**, 261-311.
- Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J. & Deshaies, R. J. (2000).** Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol Biol Cell* **11**, 3425-39.
- Watanabe, M., Fukuda, M., Yoshida, M., Yanagida, M. & Nishida, E. (1999).** Involvement of CRM1, a nuclear export receptor, in mRNA export in mammalian cells and fission yeast. *Genes Cells* **4**, 291-7.
- Weighardt, F., Biamonti, G. & Riva, S. (1995).** Nucleo-cytoplasmic distribution of human hnRNP proteins: a search for the targeting domains in hnRNP A1. *J Cell Sci* **108**, 545-55.
- Weis, K. (2000).** Identification, analysis, and use of nuclear export signals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **327**, 297-304.
- Weis, K., Dingwall, C. & Lamond, A. I. (1996).** Characterization of the nuclear protein import mechanism using Ran mutants with altered nucleotide binding specificities. *Embo J* **15**, 7120-8.
- Weis, K., Ryder, U. & Lamond, A. I. (1996).** The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *Embo J* **15**, 1818-25.
- Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y. & Taylor, S. S. (1995).** Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**, 463-73.
- Wente, S. R. (2000).** Gatekeepers of the nucleus. *Science* **288**, 1374-7.
- Wimmer, C., Doye, V., Grandi, P., Nehrbass, U. & Hurt, E. C. (1992).** A new subclass of nucleoporins that functionally interact with nuclear pore protein NSP1. *Embo J* **11**, 5051-61.
- Wolff, B., Sanglier, J. J. & Wang, Y. (1997).** Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo- cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem Biol* **4**, 139-47.
- Wolin, S. L. & Matera, A. G. (1999).** The trials and travels of tRNA. *Genes Dev* **13**, 1-10.

- Xiao, Z., McGrew, J. T., Schroeder, A. J. & Fitzgerald-Hayes, M. (1993).** *CSE1* and *CSE2*, two new genes required for accurate mitotic chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**, 4691-702.
- Yang, F., Demma, M., Warren, V., Dharmawardhane, S. & Condeelis, J. (1990).** Identification of an actin-binding protein from Dictyostelium as elongation factor 1a. *Nature* **347**, 494-6.
- Yang, Q., Rout, M. P. & Akey, C. W. (1998).** Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol Cell* **1**, 223-34.
- Yoo, C. J. & Wolin, S. L. (1997).** The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell* **89**, 393-402.
- Yoon, H., Miller, S. P., Pabich, E. K. & Donahue, T. F. (1992).** SSL1, a suppressor of a HIS4 5'-UTR stem-loop mutation, is essential for translation initiation and affects UV resistance in yeast. *Genes Dev* **6**, 2463-77.
- Yoshida, K. & Blobel, G. (2001).** The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. *J Cell Biol* **152**, 729-40.
- Zhou, Z., Luo, M. J., Sträßer, K., Katahira, J., Hurt, E. & Reed, R. (2000).** The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* **407**, 401-5.

ANHANG

In den folgenden Tabellen 6 und 7 sind die Aminosäuresequenzen aller gefundenen Kandidaten des durchgeführten funktionellen NES Assays aufgelistet.

	ORF	GEFUNDENE DOMÄNE (AS)	AMINOSÄURESEQUENZ	$\Delta nmd3$ -KOMPL.	LOK.
1	RPN11	288 - 307 (*)	IPDEGLENNIVSVLTAGVNSVAIK*	++	cyt/n
2	SCD5	613 - 873 (*)	IPQHQRSQLISPQNTFTQNQPILSPQHTYSNNQATMISP QNTYTNNQQQPQHLPPPPPPRAQQQQQAIVPPQHM YSNVQKQNNLVPTQPSYTNSPSIQSPNFLSPQNAANS YFQSLSSSPSPNPTPSNASTVNGNNASNGISSFQNTSA AMNNTQSHQTYIQQQQQQQTQQRIGGQLSQMQQH PGQLHLNNSDIHSQPNKPNYGMLGQQVHQQQQQQQ QQFPFTADVNRNSSDILGNLQSLQQQVDALQIQYNR RP*	++	cyt
3	RPL5	103 - 197	LLIARRTLQKLGLDETYKGVEEVEGEYELTEAVEDGP RPFKVFLDIGLQRTTTGARVFGALKGASDGGLYVPHS ENRFPGWDFETEEIDPELLR*	++	cyt
4	GFD1	119 - 189 (*)	KTQSKQDASKMKLLKKKIEEQREILQKTHHKNQQQ QVLMDFLNDEGSSNWVDDDEEELILQRLKTSLKl*	+	cyt
5	NIP1	130 - 149	ISQAENSDDWLTISNEFDLI	++	cyt
6	YOR280C	225 - 267 (*)	IQGITSKEGQEHNAQPEVDRKQFDKPQLEDDLDMID SLGKL*	++	cyt
7	BFR1	404 - 471 (*)	ITVEQLKKKHEELLSKQEEQTKQNIESVEKEIEKLNLD YSNKEQQVKKELEEKRLKEQEESEKDKEN*	++	cyt
8	CMK1	336 - 447 (*)	IQKLRLYLEQTESDSDFDEGSQANGSVPLKATDTS QLSKKLSEEEQSKLKSELTSKAFAQLVNTVLAKEKF LNINRVCSSSDLPGSDIKSLDEAKEKPEGKDTKTEE*	-	nuk/c
9	YHR036W	1 - 176...	MESFENLSIRDSFTSGMEHVDEELGGLSDLISKQGPT LSPQLINRFMPHFSSPSPLRNTLDFSAAKADEEEDDR MEIDEVDDTSFEEYNNPIETHTEATENAVVEEIEAT PEERQKQEKNESQDQSVVEVENIVSPHRSTVIKALLSP TDLGVAAATKVEGVVPLPPSANQD..	+	cyt/n
10	YHR036W	1 - 182...	MESFENLSIRDSFTSGMEHVDEELGGLSDLISKQGPT LSPQLINRFMPHFSSPSPLRNTLDFSAAKADEEEDDR MEIDEVDDTSFEEYNNPIETHTEATENAVVEEIEAT PEERQKQEKNESQDQSVVEVENIVSPHRSTVIKALLSP TDLGVAAATKVEGVVPLPPSANQDDNESSN...	++	cyt/n
11&12	YHR194W	395 - 424	INEGRVNMIGDVLLPDDDAASDSLQLTEILTEI	+/-	nuk/c
13	ZDS2	174 - 348...	IPDEGPRVTSRNRRLSGVKTLAHDVVLDVENDHDSK MVDLTQNLWVPADQHPNVKPNYLELIQDTLQNIQI STNQDIDENKLELGNNHVISNRKRTGSVVRPSRLKT SYTKFDEPPLADKPQEGEIQVDKRISSDIKTIRSVSL KEITEELTKISNNAGLTDSDAVTLARSLSMS...	++	cyt
14&15	TUP1	396 - 434	IPDEGPENNTTTSTDNNTMTTTTTTTTTTAMTSAEL AKDVENLGLRPG	-	nuk/c
16	MSB1	635 - 809...	PVIETGSSNFKIEIPELMEYEHDDDDSDKLKNSQKRATD SAIEELNGMVEEMMINPDDVKISITEAETFESLTKFD QYKPSNITDDDLQSSHSSAVHSLKLTNTNDSCADSS KYTADRKLAEPRKISEESKVNDSSSYSPNINLNPAS RMPSQPTYSNSDSKKAFTNESRL...	++	cyt
17	YGR287C	94 - 125	IEKTHKLGKMFITDLVINHCSEHEWFKESR	+/-	nuk/c
18	RSE1	1236 - 1362	GRNVFMMGNIENIMAEADDTFYLDYESRKKNNNM KEDDEESGSVVLQGRHGEDIEIICGSCSILGRDHQE YRSYYAPVRKVIDGDLNENFLRLSLNEQFLAKNLKS VQVEDIIQTINEVRTNYM*	++	cyt/n
19	FAA1	508 - 578	ITGANVTPEYYKNEEETSQALTSDGWFKTGDIGEWEA NGHLKIIDRKKNLVKTMNGEYIALEKLESVYR	-	nuk/c

20	YBR235W	996 - 1047	IPIAEPDLSNGNGTGSGIGNGNKLKKPVLPELSPCCSK DSLVTAMQNLGFND	+	cyt/n
21	BUD6	445 - 496	IKEFIDTVKMEISNSQNDIIRHLKEMSFSGSAISGKQTEV LPQPGLEANKHD	+/-	nuk/c
22	YDR063W	117 - 150 (*)	IREECGTGFKLIEVSSGLEDDSDVEELREQLENC*	-	nuk/c

Tab. 6: Aminosäuresequenzen der im funktionellen NES-Assay gefundenen Domänen aus den angegebenen ORFs mit einer korrekten Fortsetzung der Sequenzfolge des NES-Test Plasmids (NESTP).

(*) steht für das native Stopcodon des gefundenen ORFs. Angegeben ist zusätzlich die Komplementationsfähigkeit des letalen *Δnmd3* Phänotyps (*Δnmd3*-Kompl.) durch die gefundenen Bibliotheksplasmide und die durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelte Lokalisierung des Fusionsproteins (Lok.).

Stärke der Komplementation: ++ sehr gute - schlechte Komplementation.

Lokalisierungsangaben des Fusionsproteins: cyt: zytoplasmatische Lokalisierung, cyt/n: hauptsächlich zytoplasmatische Lokalisierung mit schwachem Anteil im Kern, nuk/c: nukleäre Akkumulation mit schwachem zytoplasmatischen Signal.

	AMINOSÄURESEQUENZ	<i>Δnmd3</i> -KOMPL.	LOK.
23	IPDEGLAGLHLY*	++	cyt/n
24	IKSPDTLCKSTEGFATENWPCVINFGELSMEEDVMHVSRRARYGVESNGDVSL*	+	cyt/n
25	ILVIPFIENLTL*	+	cyt
26	IGDELKFVKNDFILITEFDSLDISNSIFKLGD*	+	cyt/n
27	IPFRKMTLQNLK*	+	cyt
28	ILVIPFIENLTL*	+	cyt
29	IPDEGPDITIEDFPDISFNHKWSINDFNAITEDQVNSQKLAKAQQATDGLSQELVS LLD	-	nuk/c
30	IPDEGPGPGTPERSYYIYN*	-	nuk/c
31	IPDEGLYYLTLILKF*		cyt/n
32	IPDEGLRQ*	+	nuk/c
33	IPDEGPSSEQTDGESSFSVEAMLLEDLVLVSE*	+	cyt/n
34	IPDEGPATNGSACVWPT*	+	nuk/c
35	IKTEVKLKLFLSL*	+/-	cyt/n
36	IPEEGRDHHGICHAADLFQILREFEI*	-	nuk/c
37	IPDEGILYASLSWF*	+	cyt/n
38	IPDEGRFQLFR*	+/-	nuk/c
39	IQDEGRYV*	-	nuk/c
40	IPDEGPVRTTFIVYSSNNLYTI*	-	nuk/c
41	ILRPI*	-	nuk/c
42	IPDEGLSANFELDCITIRLLQSCLCFCPAAHGEISEAKMGTVKSKSNSKSNKRQ*	+	cyt
43	IPDEGRFFREYVFIVELLSLELF*	+	cyt
44	ILPNSPT*	-	nuk/c
45	ITVTAFEELVI*	+	cyt
46	ITVTAFEELVI*	++	cyt
47	IDLVKQFNDNATIRVP*	+	cyt
48	IPYFFGNGLLI*	-	nuk/c
49	IFGGLNG*	+/-	cyt/n
50	kein insert		
51	IKTHS*	-	nuk/c
52	IEEQLQEVIDILTSGDSVGNT*	+/-	nuk/c
53	ISTSRMSIK*	+/-	nuk/c

54	IQLMDLFGALEL*	+	cyt
55	IHFSAFNILD*	++	cyt/n
56	INLKNLSV*	+	cyt
57	IQFAVDMRL*	+/-	cyt
58	ICHQPVEVSSFLSQKSR*	-	nuk/c
59	IEEQLQEVIDILTSVGDSVGNT*	++	nuk/c
60	ILDIRMQHISIS*	++	cyt
61	ICLSGEFSSMMDIRDKR	+	nuk/c
62	ILDIRMQHISIS*	++	cyt
63	IFSMACLNLE*	+	cyt
64	kein insert		
65	ILDIRMQHISIS*	++	cyt
66	ICLEKGATPSQSGEFGQTWSFRGTSRNVSVGEPAEG	-	nuk/c
67	ISESTSFVVKLDLLKPPICCD	-	nuk/c
68	kein insert		
69	IRFARLSLNY*	++	cyt
70	ILDIRMQHISIS*	+	cyt
71	ILVIVLNSLVLG*	+	cyt
72	IDLIYSLSCSV*	+	cyt
73	IRQPQKPIIRMNCSRTKFNYCYGNIHQ*	-	nuk/c
74	ILDINLKNLSV*	++	cyt
75	ISPLFTPCNTQF*	+/-	cyt/n
76	ILDINLKNLSV*	++	cyt
77	IILHDFANM*	+	cyt/n

Tab. 7: Aminosäuresequenzen der im funktionellen NES-Assay gefundenen Domänen, die keine korrekte Fortsetzung der Kodierungssequenz tragen oder aus intergenen Regionen stammen.

Weitere Erklärung siehe Tab. 6.